

Opinnäytetyö (AMK)

Bio- ja Elintarviketekniikka | Laboratoriotekniikka

2018

Tero Mäkilä

ANALYYSILAITTEEN TESTAUS JA VERIFIONTI IVD-KÄYTTÖÖN

Tero Mäkilä

ANALYYSILAITTEEN TESTAUS JA VERIFIOINTI IVD-KÄYTTÖÖN

Työn tavoitteena oli karakterisoida IEF-yksikkö päivitettäessä laitteistoa uudempaan. Isoelektristä fokusointi –yksikköä käytetään hemoglobiinopatioiden diagnosoimiseen. Hemoglobiinopatioita ovat esimerkiksi eri talassemiat ja sirppisoluanemia. Karakterisointi oli työn käytännön osuudessa ja muut vaiheet käsiteltiin teoreettisesti. Yksiköllä ajetaan agaroosigeelejä, joiden päälle pipetoidaan verinäytteitä sekä kontrolleja. Kun geeliin syötetään sähkövirtaa, varaukselliset molekyylit kulkeutuvat geelillä kohti omaa pI-pistettään. Kulkeutumisen mahdollistaa pH-gradientti, jonka geelin kantaja-amfolyytit muodostavat.

Työssä karakterisoitiin ensin vanhan laitteen jäähdytyslevyn jäähdytysteho sekä veden virtaus. Sen jälkeen karakterisoitiin teholahteen syöttämää virtaa geelijaon ollessa käynnissä. Niitä verrattiin uuteen laitteeseen. Lisäksi molemmilla suoritettiin eri olosuhteissa geelijaaja ja verrattiin kontrollien ajautumista eri laitteiden välillä. Työssä käytettiin AFSC-, FAS- sekä Hb 610 – kontrolleja. Kontrollien vyöhykkeiden välisiä etäisyyksiä mitattiin työntömitalla ja verrattiin niitä laadunvalvonnan spesifikaatioihin. Työssä oli yhteensä 76 eri testiä.

Lämpötilan ja tehon nostamisen vaikutukset laitteistojen erottelykykyyn olivat pieniä. Korkeampi lämpötila ja kosteus kuitenkin lisäsivät hajontaa ajautuvuudessa geelin sisällä. Työn tuloksista voidaan päätellä, että eri laitteet toimivat samalla tavalla ja molempia voidaan käyttää geelijaajassa vesijäähdyttimen lämpötilan ollessa 8 °C – 14 °C. Karakterisoinnin perusteella Wallac Oy voi siirtyä verifiointivaiheeseen.

ASIASANAT:

IEF, karakterisointi, IVD-käyttö, kantaja-amfolyytti, hemoglobiini, hemoglobiinopatia, talassemia.

Tero Mäkilä

TESTING AND VERIFICATION OF ANALYSIS INSTRUMENT FOR IVD USE

The objective of the thesis was to characterize the IEF unit when upgrading the equipment. The isoelectric focusing unit is used to help diagnose hemoglobinopathies such as thalassemias and sickle cell anemia. The characterization comprised the practical part of thesis, while other phases were considered in theory. The unit is used to run agarose gels, on to which blood samples and controls are pipetted. When electricity is conducted to the gel, charged molecules migrate on the gel toward their own pI point. Migration is possible due to the pH-gradient, created by the gel's carrier ampholytes.

The cooling power and water flow of old unit's cooling plate were characterized first. The next step was the characterization of the power supply's conducting ability during the gel processing. These parameters were compared to the new unit. The circumstances of the experiments were different and results of the experiments were compared between different units. AFSC, FAS and Hb 610 controls were used in the thesis project. The distance between bands was measured with a hand caliper and the results were compared to quality assurance specifications. In total 76 different experiments were conducted.

The effect of increased temperature and power on the separation ability of different units was small. However, higher temperature and humidity increased the dispersion inside gel. It can be concluded that different units function in the same way and both can be used to process the gels when the water circulation temperature is between 8 °C and 14 °C. On the basis of this thesis, Wallac Oy can initiate verification.

KEYWORDS:

IEF, characterization, IVD use, carrier ampholyte, hemoglobin, hemoglobinopathy, thalassemia.

SISÄLTÖ

KÄYTETYT LYHENTEET	8
1 JOHDANTO	9
2 HEMOGLOBIINIT	10
2.1 Hemoglobiinien kehitys	11
2.2 Hemoglobiinivariantit	13
2.3 Talassemiat	14
3 ISOELEKTRINEN FOKUSOINTI	17
3.1 Amfolyytit	18
3.2 Geelien koostumus	20
4 ANALYYSILAITTEEN TODENNUS VAIHEITTAIN	22
4.1 Käyttäjävaatimukset	22
4.2 Karakterisointi	22
4.3 Verifiointi	22
4.4 Myytäväksi valmistuneen laitteen asennus ja käyttöönotto	23
5 MATERIAALIT JA MENETELMÄT	25
5.1 Geeliajo	27
5.2 Vyöhykkeiden mittaaminen ja tunnistus	30
6 TULOKSET	33
6.1 Eri lämpötilat	33
6.2 Kolme yksikköä sarjassa	42
6.3 Pienet geelit	54
6.4 Tehon lisäys 40 Wattiin	60
6.5 Olosuhdehuone	72
7 PÄÄTELMÄT	76
LÄHTEET	78

LIITTEET

- Liite 1. Karakterisointisuunnitelma.
- Liite 2. Soveltuvuustutkimuksen suunnitelma.
- Liite 3. Testien numerointi.
- Liite 4. Laitteet selkokielellä.
- Liite 5. Kuvat laitteista.

KAAVAT

Kaava 1. Keskiarvo.	31
Kaava 2. Keskihajonta.	31
Kaava 3. Suhteellinen keskihajonta	31

KUVAT

Kuva 1. Hemoglobiinin rakenne. ²	11
Kuva 2. Globiiniketjujen tuotantotasot eri kehitystasoilla. ¹	12
Kuva 3. IEF-menetelmän toimintaperiaate. Kuvassa vasemmalla puolella ei vielä johdeta virtaa pH-gradienttiin. Oikeanpuoleisessa tilanteessa molekyylit ovat ajautuneet pl:nsä. ³	18
Kuva 4. Kantaja-amfolyyttien kulkeutuminen sähkökentässä. ³	19
Kuva 5. Kantaja-amfolyyttien kulkeutuminen sähkökentässä varaustensa mukaisesti.	20
Kuva 6. Glyserolin rakennekaava. ⁷	21
Kuva 7. Agarosiin rakennekaava. ⁹	21
Kuva 8. Kontrollien pipetoimisjärjestys isolle geelille.	28
Kuva 9. Kontrollien pipetoimisjärjestys pienelle geelille.	29
Kuva 10. Vyöhykkeiden kulkeutuminen. ¹⁶	32
Kuva 11. Hb A1 C ja Hb C vyöhykkeiden välinen ero AFSC-kontrollissa (hyväksymisraja ≥ 15.0 mm).	33
Kuva 12. Hb A1 C ja Hb C vyöhykkeiden välinen ero AFSC-kontrollissa (hyväksymisraja ≥ 15.0 mm).	34
Kuva 13. Hb A ja Hb F vyöhykkeiden välinen ero FAS-kontrollissa (hyväksymisraja ≥ 1.5 mm).	36
Kuva 14. Hb A ja Hb F vyöhykkeiden välinen ero FAS-kontrollissa (hyväksymisraja ≥ 1.5 mm).	37
Kuva 15. Hb A ja Hb F _{ac} vyöhykkeiden välinen ero FAS-kontrollissa (hyväksymisraja ≥ 0.75 mm).	39
Kuva 16. Hb A ja Hb F _{ac} vyöhykkeiden välinen ero FAS-kontrollissa (hyväksymisraja ≥ 0.75 mm).	40
Kuva 17. Hb A1 C ja Hb C vyöhykkeiden välinen ero AFSC-kontrollissa (hyväksymisraja ≥ 15.0 mm).	42
Kuva 18. Hb A1 C ja Hb C vyöhykkeiden välinen ero AFSC-kontrollissa (hyväksymisraja ≥ 15.0 mm).	43

Kuva 19. Hb A1 C ja Hb C vyöhykkeiden välinen ero Hb 610 -kontrollissa (hyväksymisraja ≥ 15.0 mm).	45
Kuva 20. Hb A1 C ja Hb C vyöhykkeiden välinen ero Hb 610 -kontrollissa (hyväksymisraja ≥ 15.0 mm).	46
Kuva 21. Hb A ja Hb F vyöhykkeiden välinen ero FAS-kontrollissa (hyväksymisraja ≥ 1.5 mm).	48
Kuva 22. Hb A ja Hb F vyöhykkeiden välinen ero FAS-kontrollissa (hyväksymisraja ≥ 1.5 mm).	49
Kuva 23. Hb A ja Hb Fac vyöhykkeiden välinen ero FAS-kontrollissa (hyväksymisraja ≥ 0.75 mm).	51
Kuva 24. Hb A ja Hb Fac vyöhykkeiden välinen ero FAS-kontrollissa (hyväksymisraja ≥ 0.75 mm).	52
Kuva 25. Hb A1 C ja Hb C vyöhykkeiden välinen ero AFSC-kontrollissa (hyväksymisraja ≥ 15.0 mm).	54
Kuva 26. Hb A1 C ja Hb C vyöhykkeiden välinen ero Hb 610 -kontrollissa (hyväksymisraja ≥ 15.0 mm).	56
Kuva 27. Hb A ja Hb F vyöhykkeiden välinen ero FAS-kontrollissa (hyväksymisraja ≥ 1.5 mm).	58
Kuva 28. Hb A ja Hb Fac vyöhykkeiden välinen ero FAS-kontrollissa (hyväksymisraja ≥ 0.75 mm).	59
Kuva 29. Hb A1 C ja Hb C vyöhykkeiden välinen ero AFSC-kontrollissa (hyväksymisraja ≥ 15.0 mm).	60
Kuva 30. Hb A1 C ja Hb C vyöhykkeiden välinen ero AFSC-kontrollissa (hyväksymisraja ≥ 15.0 mm).	61
Kuva 31. Hb A1 C ja Hb C vyöhykkeiden välinen ero Hb 610 -kontrollissa (hyväksymisraja ≥ 15.0 mm).	63
Kuva 32. Hb A1 C ja Hb C vyöhykkeiden välinen ero Hb 610 -kontrollissa (hyväksymisraja ≥ 15.0 mm).	64
Kuva 33. Hb A ja Hb F vyöhykkeiden välinen ero FAS-kontrollissa (hyväksymisraja ≥ 1.5 mm).	66
Kuva 34. Hb A ja Hb F vyöhykkeiden välinen ero FAS-kontrollissa (hyväksymisraja ≥ 1.5 mm).	67
Kuva 35. Hb A ja Hb Fac vyöhykkeiden välinen ero FAS-kontrollissa (hyväksymisraja ≥ 0.75 mm).	69
Kuva 36. Hb A ja Hb Fac vyöhykkeiden välinen ero FAS-kontrollissa (hyväksymisraja ≥ 0.75 mm).	70
Kuva 37. Hb A1 C ja Hb C vyöhykkeiden välinen ero AFSC-kontrollissa (hyväksymisraja ≥ 15.0 mm).	72
Kuva 38. Hb A1 C ja Hb C vyöhykkeiden välinen ero Hb 610 -kontrollissa (hyväksymisraja ≥ 15.0 mm).	73
Kuva 39. Hb A ja Hb F vyöhykkeiden välinen ero FAS-kontrollissa (hyväksymisraja ≥ 1.5 mm).	74
Kuva 40. Hb A ja Hb Fac vyöhykkeiden välinen ero FAS-kontrollissa (hyväksymisraja ≥ 0.75 mm).	75

TAULUKOT

Taulukko 1. Hb F:n ja Hb A:n konsentraatio iän mukaan. ¹	13
Taulukko 2. Talassemiat. ¹	16
Taulukko 3. Tarvittavat materiaalit ja liuokset testien tekemiseen.	25
Taulukko 4. Testeissä käytetyt kontrollit ja muut näytteet:	26
Taulukko 5. Testeissä käytetyt IEF-yksiköt, vesijäähdyttimet ja virtalähteet. Koodit aukaistuna liitteessä 4 (luottamuksellinen).	26
Taulukko 6. Geelien ajo-olosuhteet.	30
Taulukko 7. Tulokset Hb A1 C ja Hb C välisistä eroista AFSC-kontrollissa eri lämpötiloilla.	35
Taulukko 8. Tulokset Hb A ja Hb F välisistä eroista FAS-kontrollissa eri lämpötiloilla.	38
Taulukko 9. Tulokset Hb A ja Hb Fac välisistä eroista FAS-kontrollissa eri lämpötiloissa.	41
Taulukko 10. Tulokset Hb A1 C ja Hb C välisistä eroista AFSC-kontrollissa kolmen yksikön sarjassa.	44
Taulukko 11. Tulokset Hb A1 C ja Hb C välisistä eroista Hb 610-kontrollissa kolmen yksikön sarjassa.	47
Taulukko 12. Tulokset Hb A ja Hb F välisistä eroista FAS-kontrollissa kolmen yksikön sarjassa.	50
Taulukko 13. Tulokset Hb A ja Hb Fac välisistä eroista FAS-kontrollissa kolmen yksikön sarjassa.	53
Taulukko 14. Tulokset Hb A1 C ja Hb C välisistä eroista AFSC-kontrollissa pienillä geeleillä.	55
Taulukko 15. Tulokset Hb A1 C ja Hb C välisistä eroista Hb610-kontrollissa pienillä geeleillä.	57
Taulukko 16. Tulokset Hb A ja Hb F välisistä eroista FAS-kontrollissa pienillä geeleillä.	58
Taulukko 17. Tulokset Hb A ja Hb Fac välisistä eroista FAS-kontrollissa pienillä geeleillä.	59
Taulukko 18. Tulokset Hb A1 C ja Hb C välisistä eroista AFSC-kontrollissa tehon lisäyksessä 40 Wattiin.	62
Taulukko 19. Tulokset Hb A1 C ja Hb C välisistä eroista Hb610-kontrollissa tehon lisäyksessä 40 Wattiin.	65
Taulukko 20. Tulokset Hb A ja Hb F välisistä eroista FAS-kontrollissa tehon lisäyksessä 40 Wattiin.	68
Taulukko 21. Tulokset Hb A ja Hb Fac välisistä eroista Fac-kontrollissa tehon lisäyksessä 40 Wattiin.	71
Taulukko 22. Tulokset Hb A1 C ja Hb C välisistä eroista AFSC-kontrollissa olosuhdehuoneessa.	72
Taulukko 23. Tulokset Hb A1 C ja Hb C välisistä eroista Hb610-kontrollissa olosuhdehuoneessa.	73
Taulukko 24. Tulokset Hb A ja Hb F välisistä eroista FAS-kontrollissa olosuhdehuoneessa.	74
Taulukko 25. Tulokset Hb A ja Hb Fac välisistä eroista Fac-kontrollissa olosuhdehuoneessa.	75

KÄYTETYT LYHENTEET

Lyhenne	Lyhenteen selitys (Lähdeviite)
Hb	Hemoglobiini
IEF	Isoelektrinen fokusointi
pI	Isoelektrinen piste

1 JOHDANTO

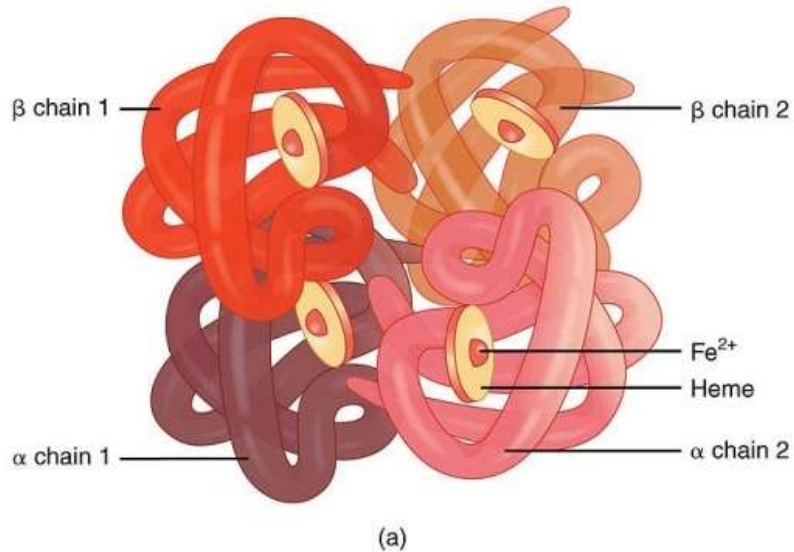
Opinnäytetyö käsittelee in vitro diagnostiikka –analyysilaitteen testausta ja verifiointia tilanteessa, missä laitteistoa päivitetään uudempaan. Työssä analyysilaitteena toimii Wallac Oy:n isoelektrinen fokusointi –yksikkö eli IEF-yksikkö. Yksikköä käytetään hemoglobiinimolekyylien isoelektriseen erottamiseen potilasnäytteestä. Hemoglobiinin proteiinien epänormaali muodostuminen geenivirheen takia aiheuttaa hemoglobinopatioita ja talassemiat aiheutuvat normaalin hemoglobiinituotannon vähentymisestä. Ne saattavat aiheuttaa anemiaa, joka pahimmillaan johtaa kuolemaan. Sirppisoluanemia on yleisin hemoglobinopatia, mutta kaikki hemoglobiinivariantit eivät aiheuta anemiaa eikä niitä sen vuoksi luokitella sairauksiksi. Wallac Oy päivittää elektroforeesilaitteen vastaamaan tämän hetken viranomais- ja asiakasvaatimuksia. Ennen kuin päivitetty laite voidaan vapauttaa myyntiin, tulee uuden laitteen ominaisuudet karakterisoida, optimoida ja todentaa sekä viranomaisten että asiakkaiden vaatimusten mukaisiksi eli verifioida. Karakterisointi tehtiin työn käytännön osuudessa ja muut osiot käsitellään teoreettisesti.

2 HEMOGLOBIINIT

Hemoglobiinin päätehtävä hapensitojaproteiinina on kuljettaa happea (O_2) keuhkoista kudoksiin ja paluujätteenä kuljettaa hiilidioksidi (CO_2) kudoksista keuhkoihin. Hemoglobiinia on elimistöä kiertävissä punasoluissa, joita on noin puolet veren tilavuudesta. Hemoglobiinia puolestaan on keskimäärin noin 15 % veren massasta. Hemoglobiinimolekyyli koostuu neljästä globiiniketjusta ja hemiryhmästä. Globiiniryhmät muodostuvat neljästä proteiiniketjusta, joista jokaista ympäröi prosteettinen ryhmä eli hemi. O_2 sitoutuu hemiryhmiin, jotka ovat rautaa sisältäviä porfyrynirenkaita. Yksi hemoglobiinimolekyyli kykenee kuljettamaan siis neljää happimolekyyliä. Kuvassa 1 havainnollistetaan hemoglobiinin rakennetta.¹

Hapen sitoutumiseen vaikuttaa suuresti punasolujen glykolyysin metabolisen väliuutteen 2,3-bisfosfoglyseraatin (2,3-DPG) konsentraatio veressä. Kohonnut konsentraatio vähentää hemoglobiinin affiniteettiä happeen stabiloimalla deoksihemoglobiinia eli happea sitonutta hemoglobiinin muotoa. 2,3-DPG sitoutuu varmemmin normaalin aikuisen hemoglobiinin β -ketjujen kesken kuin sikiöaikaisen hemoglobiinin γ -ketjujen kesken. Sen vuoksi sikiöaikaisella hemoglobiinilla on korkeampi affiniteetti happeen mahdollistaen hapen kuljettamisen istukan kautta äidin verestä sikiön verenkiertoon.¹

Paljastuneet hemiryhmät hapettuvat välittömästi ferrihemiksi hapen vaikutuksesta. Reaktiossa Fe^{+2} hapettuu Fe^{+3} :ksi. Hemiryhmää pitääkin varjella spontaanilta hapettumiselta, jonka vuoksi ne sijaitsevat syvällä globuliiniketjujen halkeamien sisällä. Globiiniketjut ympäröivät hemiryhmät hydrofobisilla aminohapoilla, jotka hylkivät hapettumisen aiheuttavaa vettä. Pienetkin muutokset aminohapoissa voivat vaikuttaa hemoglobiinin hapensitomisominaisuuksiin.¹



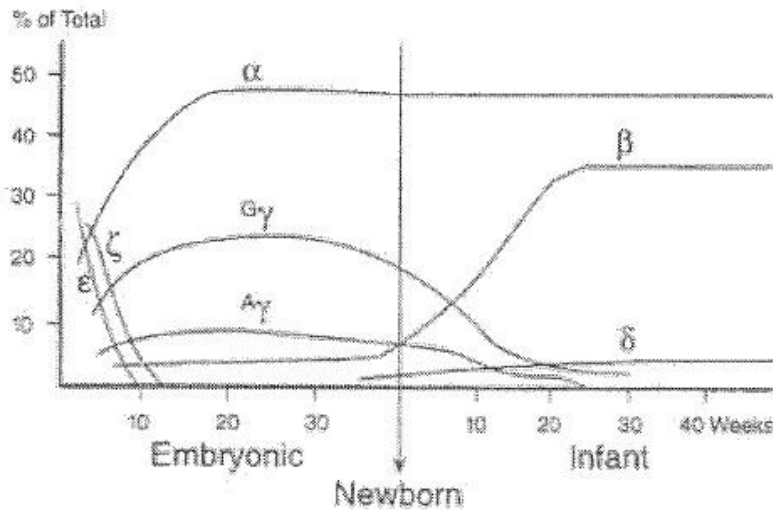
Kuva 1. Hemoglobiinin rakenne.²

2.1 Hemoglobiinien kehitys

Globiiniketjuja koodaavia geenejä sääntelee kolme spesifistä kehitystasoa: alkioaste, vastasyntynyt ja vauvataso. Kehitystasojen aikana muodostuvia toiminnallisia globiiniketjuja on löydetty kaiken kaikkiaan kahdeksan erilaista. Niitä merkitään kreikkalaisilla kirjaimilla. Kromosomi 16 sääntelee globiiniketju zetan (ζ) ja kahden alphaketjun ($\alpha 1$ ja $\alpha 2$) synteisiä. Kromosomi 11 puolestaan sääntelee globiiniketju epsilonin (ϵ), deltan (δ) sekä kahden gammaketjun (γ ja $\text{A}\gamma$) synteisiä.¹

Näistä kahdeksasta globiiniketjusta muodostetaan kahdeksan erilaista hemoglobiinin tetrameeriä. Alkioasteen tetrameerit ovat $\zeta 2\epsilon 2$ (Hb Gower-I), $\alpha 2\epsilon 2$ (Hb Gower-II) sekä $\zeta 2\gamma 2$ ja $\zeta 2\text{A}\gamma 2$ (Hb Portland-I). Alkioasteen tetrameerien määrä vähentyy merkityksettömäksi sikiövaiheen kolmanteen kuukauteen mennessä. Ne korvautuvat sikiön kehityksessä kahdella sikiökautisella hemoglobiinilla Hb F ($\alpha 2\gamma 2$ ja $\alpha 2\text{A}\gamma 2$) sekä kahdella aikuisen hemoglobiinilla Hb A ($\alpha 2\beta 2$) ja Hb A₂ ($\alpha 2\delta 2$). Hb F:lla ja Hb Portland-I:lla on kaksi eri muotoa johtuen kahden γ -geenin olemassaolosta kromosomissa 11. γ -ketjussa on aminohappo glysiini ja $\text{A}\gamma$ -ketjussa puolestaan alaniini γ -globiiniketjun kohdassa 136.

Syntymän hetkellä koko γ -ketjutuotannosta noin 70 % on $G\gamma$:a ja noin 30 % $A\gamma$:a. Kuvassa 2 näkyy globiiniketjujen tuotantotasoa jokaisella kehitystasolla. Myös kahta vähäisemmässä määrässä esiintyvää hemoglobiinia voidaan tuottaa tiettytyyppisten α -talasemiaa kantavien henkilöiden syntymän hetkellä, Hb Portland-II:a ($\zeta\beta_2$) sekä Hb Portland-III:a ($\zeta\delta_2$).¹



Kuva 2. Globiiniketjujen tuotantotasoa eri kehitystasoilla.¹

Kunkin hemoglobiinityypin määrä vaihtelee iän, geneettisen taustan ja globiiniketjua koodaavan kromosomin haplotyyppin mukaan. Tavallisesti vastasyntyneillä Hb F:n määrä on noin 60-80%. Hb A:n ja niukasti havaittavan Hb A₂:n määrä on noin 15-40%. Aikuisen hemoglobiinista normaalisti >96% on Hb A:a ja 2,5% ± 0,3% on Hb A₂:a. Tyypillisesti Hb F:n määrä on alle 2% hemoglobiinin kokonaismäärästä aikuisella. Tyypilliset Hb F:n ja Hb A:n konsentraatiot eri iässä näkyvät taulukossa 1.¹

Taulukko 1. Hb F:n ja Hb A:n konsentraatio iän mukaan.¹

Ikä	Hb F (%)	Hb A (%)
1 päivä	77,0 ± 7,3	23,0 ± 7,3
5 päivää	76,8 ± 5,8	23,2 ± 5,8
3 viikkoa	77,0 ± 7,3	30,0 ± 7,3
6-9 viikkoa	52,9 ± 11,0	47,1 ± 11,0
3-4 kuukautta	4,7 ± 2,2	95,3 ± 2,2
8-1 kuukautta	1,6 ± 1,0	98,4 ± 1,0
Aikuinen	< 2,0	98

2.2 Hemoglobiinivariantit

Tänä päivänä on dokumentoitu yli 700 erilaista hemoglobiinivarianttia. Ne muodostuvat aminohappojärjestyksen muutoksista α -, β -, γ - tai δ -ketjuissa Hb A-, Hb F- ja Hb A₂ – tetrameereissä. Aminohappojen substituutiot, deletiot, lisäykset, pidennykset tai fuusioitumiset globiiniketjuissa aiheuttavat muutoksia variantteihin.¹

Suurin osa hemoglobiinivarianteista aiheutuu aminohappojen substituutioista yksittäisessä globiiniketjussa. On olemassa α -, β -, γ - ja δ -ketjuvariantteja, joista suurin osa ei kuitenkaan tuota kliinisesti merkittäviä epänormaalisti toimivia hemoglobiineja. Noin 25 % hemoglobiinivarianteista toimii epänormaalisti tavalla.¹

Sirppisoluanemiaa aiheuttava Hb S on hemoglobinopatia, jolla β -ketjun kohdassa 6 glutamiinihappo on substituutunut valiinilla. Substituutio johtaa erittäin suureen liukoisuuden laskuun hemoglobiinimolekyylin pelkistyessä, jolloin muodostuu sirpin muotoinen punasolu. Se aiheuttaa monia eri komplikaatioita, kuten tuskallisia tukkeumia käsiin ja jalkoihin.¹

Muutamilla varianteilla on kahden aminohapon substituutio, joita kutsutaan kahdeksi pistemutaatioksi. Sellaisia ovat esimerkiksi Hb C-Harlem ja Hb Korle Bu. Suurimmassa osassa näissä varianteissa mutaatiot tapahtuvat β -ketjussa.¹

Muita variantteja ilmenee, kun aminohappoja puuttuu deleetion takia, niitä on liikaa li-
säysten takia tai jopa näiden molempien yhdistelmän takia. Ne aiheuttavat hemoglobii-
nille epänormaalin hapensitomiskyvyn sekä ilmentymisen epävakaana hemoglobiinina.¹

2.3 Talassemiat

Talassemiot ovat maailman yleisin geneettinen häiriö ja ne esiintyvät monipuolisena ryh-
mänä. Ne ilmaantuvat tiettyjen globiiniketjujen tuotannon vähentyessä. Talassemiaan
sairastuneet henkilöt tuottavat normaaleja globiiniketjuja poikkeavan alhaisilla tasoilla tai
heiltä saattaa kokonaan puuttua geneettinen kyky tuottaa tiettyä globiiniketjua.¹

β -talassemiassa β -globiinin tuotantoa säätelevä DNA-informaatio on osittain tai koko-
naan viallinen. Siitä seuraa β -ketjujen alituotanto (β^+ -thal) tai täydellinen puuttuminen
(β^0 -thal). Henkilöt, joilla on ainoastaan yksi β -globiinigeeni ovat heterotsygoottisia kanta-
jia eivätkä yleensä kärsi sen haitallisista vaikutuksista terveyteen. Hb A:n määrä vähe-
nee, koska ainoastaan yksi β -geeni ilmenee normaalisti. Hb A₂:n määrä tyypillisesti nou-
see yli 3,5 %:n kokonaishemoglobiinikonsentraatiosta. Myös 50 % tapauksista on obser-
voitu Hb F:n määrän nousemista. β^0 -thal homotsygoottinen potilas kärsii vakavista kas-
vuongelmista luiden kehittymisen häiriintyessä sekä vakavasta anemiasta. Tilan vaka-
vuus riippuu peritystä mutaatiosta. Hb A₂ tasot puolestaan nousevat 3.5-7.0% välille ko-
konaishemoglobiinista.¹

α -talassemia puolestaan on heterogeeninen geneettinen sairaus. Se on monimutkainen,
koska jokainen ihminen perii kaksi α -geeniä, α_1 ja α_2 , kummaltakin vanhemmaltaan.
Nämä kaksi geeniä eivät kuitenkaan tuota α -ketjuja yhtä paljon, joten α -talassemia voi
muodostua yhden, kahden, kolmen tai neljän puutteellisen tai puuttuvan α -geenin takia.
Se tekee siitä β -talassemiata monimutkaisemman.¹

Yhden α -geenin puuttuessa ilmenee heterotsygoottinen α -talassemia-2 (α -thal-2). α -ket-
jujen tuotanto voi vähentyä jopa 25 % normaalista. Tilaa on vaikea diagnosoida aikui-
sissa. Yleensä he ovat hiljaisia kantajia eikä heille aiheudu terveydellisiä vaikutuksia.¹

Kahden α -ketjun puuttuessa kyseessä on joko homotsygoottinen α -thal-2 (α -/ α - tai $-\alpha$ -/ α -)
tai heterotsygoottinen α -thal-1 ($-$ / $-\alpha$). Tila voi aiheutua kahdella eri tapaa. Kummal-
takin vanhemmalta puuttuu yksi α -geeni kromosomista (α -/ α - tai $-\alpha$ -/ α -) tai jälkeläinen
perii normaalin kromosomin toiselta vanhemmalta ja toiselta kromosomin, josta α -geenit

puuttuvat kokonaan (- $\alpha\alpha$). Tila aiheuttaa aikuisissa lievää mikrosyyttistä anemiaa ja hypokromiaa, joka joskus voidaan sekoittaa raudanpuuteanemiaan.¹

Hb H (β_4) sairaus johtuu kolmesta puuttuvasta α -geenistä ($-\alpha/--$). Ainoastaan yksi aktiivinen geeni on toimintakykyinen ja pystyy tuottamaan juuri tarpeeksi α -globiiniketjuja ylläpitämään elämää. Ylimääräiset ei α -globiiniketjut yhdistyvät β_4 ja γ_4 molekyyleiksi, joilla on erittäin korkea affiniteetti hapteen. Hb H on epävaka ja saostuu erytrosyytteihin, mikä aiheuttaa hemolyyttistä anemiaa. Sairaus onkin nimetty aiheutuvan anemian mukaisesti Hb H:ksi.¹

Kaikkein vakavin α -talassemioiden muoto on homotsygoottinen α -thal-1 (- α -/-). Tila tunnetaan sikiön hydropsina eli vesipöhönä ja se johtaa vääjäämättä vastasyntyneen kuolemaan, koska keho ei pysty tuottamaan yhtäkään hemoglobiinimolekyyliä. Taulukossa 2 käydään läpi talassemioihin liittyvät termit, geneettinen kunto sekä määritelmät.¹

Taulukko 2. Talassemiat.¹

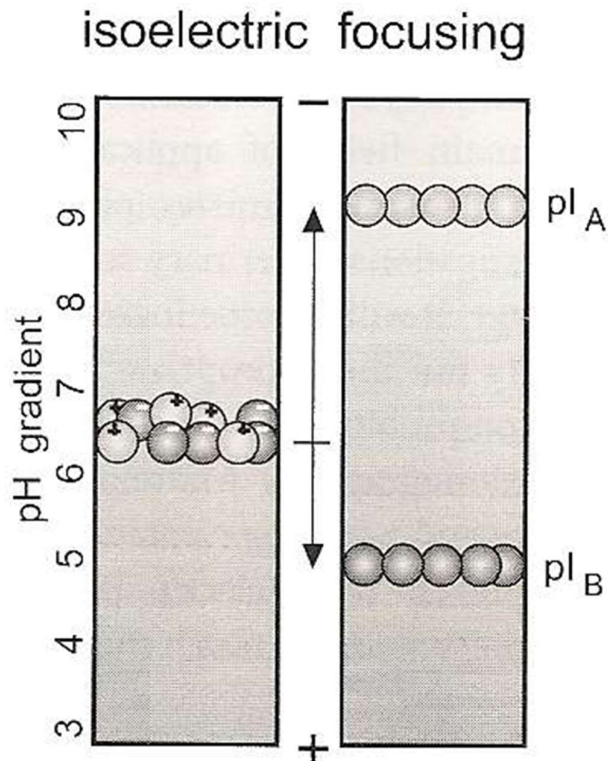
Käytetyt termit	Geneettinen kunto	Määritelmä
α -geenit	$\alpha\alpha/\alpha\alpha$	Geenit peritään molemmilta vanhemmilta
Deleetio	$-\alpha/\alpha\alpha$	Yksi α -geeni deleetioitunut, peritään toiselta vanhemmalta
(Trans) α -thal-2 homotsygoottinen	$-\alpha/-\alpha$	Kaksi α -geeniä deleetioitunut, peritään molemmilta vanhemmilta
(Cis) α -thal-1 heterotsygoottinen	$- -/\alpha\alpha$	Kaksi α -geeniä deleetioitunut, peritään molemmilta vanhemmilta
Hb H	$- -/-\alpha$	Kolme α -geeniä deleetioitunut, peritään molemmilta vanhemmilta
α -thal-1 homotsygoottinen	$- -/- -$	Neljä α -geeniä deleetioitunut, peritään molemmilta vanhemmilta
β -geenit	β/β	Geenit peritään molemmilta vanhemmilta
Vähentynyt tuotanto	β^+	Osittaisdeleetio β -ketjun tuotannossa
Ei β -ketjua	β^0	β -ketjut puuttuvat

3 ISOELEKTRINEN FOKUSOINTI

Isoelektristä fokusointia voidaan käyttää amfoteeristen aineiden, kuten peptidien ja proteiinien erotteluun. Tekniikkaa hyödynnettäessä molekyylit liikkuvat pH-gradientissa kohti katodia tai anodia. Ne pysähtyvät saavuttaessaan oman isoelektrisen pisteensä, $pI:n$, jossa niiden nettovaraus on nolla. Täten molekyylit eivät ole enää varautuneita eikä sähkökentällä ole niihin vaikutusta. Vaikka molekyylit kulkeutuisivatkin pois omalta $pI:n$, niille muodostuisi jälleen nettovaraus ja ne kulkeutuisivat takaisin sähkövirran vaikutuksesta. Oikean pH-alueen löytyminen näytteelle on tärkeää, sillä jotkin molekyylit voivat olla epävakaita tietyissä pH-arvoissa. Kuvassa 3 havainnollistetaan isoelektrisen fokusoinnin periaatetta.³

Proteiinien nettovaraus riippuu sen sivuketjuissa olevien aminohappojen negatiivisten ja positiivisten varausten summasta. Yhdistelmäproteiineilla nettovaraus riippuu myös sokeri- tai nukleiinihappopuolikkaista. Tällaisia ovat esimerkiksi glyko- ja nukleoproteiinit.³

IEF:lla saadaan tarkkoja proteiinivyöhykkeitä sekä korkean erotuskyvyn tuloksia. Fokusoinnilla on tarkka päätepiste, jolloin proteiinien ryhmittäminen pI -pisteeseensä on vaaka ilman aikarajoitusta.³



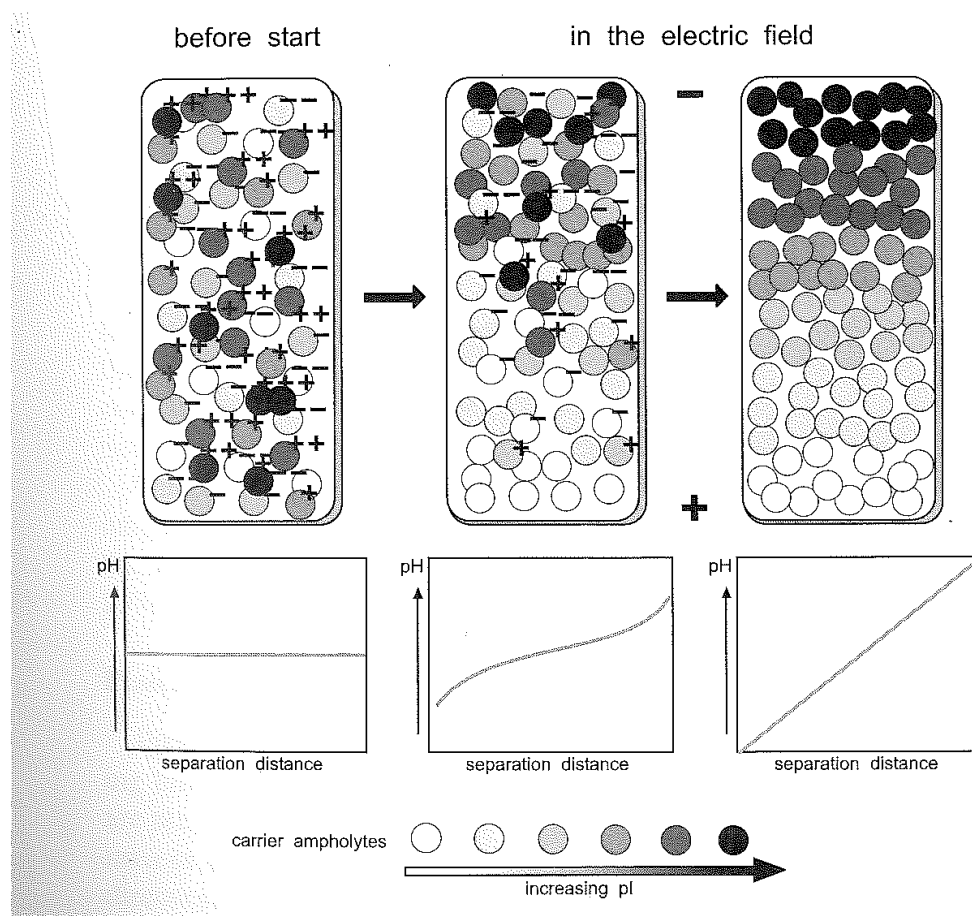
Kuva 3. IEF-menetelmän toimintaperiaate. Kuvassa vasemmalla puolella ei vielä johdeta virtaa pH-gradienttiin. Oikeanpuoleisessa tilanteessa molekyylit ovat ajautuneet pI:nsä.³

3.1 Amfolyytit

IEF-analyysia varten tarvitaan stabiili ja lineaarinen pH-gradientti. Sellainen voidaan saavuttaa kahden erilaisen molekyylin avulla, joita ovat kantaja-amfolyytit ja akryyliamidopuskurit. Tässä työssä käytettiin amfolyyttejä, joten vain niihin keskitytään tässä tekstissä.⁴

Kantaja-amfolyytit ovat amfoteerisia elektrolyyttejä. Ne ovat sekoitus alifaattisia amino- ja karboksylaattiryhmiä sisältäviä molekyylejä. Ne ovat kooltaan pieniä, n. 300-1000 Da, monivarauksellisia orgaanisia puskurimolekyylejä, joilla on lähekkäiset pI-arvot ja korkea sähkönjohtavuus. Amfolyytit sisällytetään suoraan IEF-geeleihin. Sähkökentässä amfolyytit jakautuvat tasaiseksi pH-gradientiksi, joka kasvaa lineaarisesti anodilta katodiin. pH-gradientin kulmakerroin määritetään amfolyyttien peittämän alan pH-intervallista sekä elektrodien etäisyydestä toisistaan.⁴

Korkean pI -pisteen omaavat kantaja-amfolyytit ovat positiivisesti varautuneita ja matalan pI -pisteen omaavat puolestaan negatiivisesti. Täten IEF:n käyttö rajoittuu vain joko positiivisesti tai negatiivisesti varautuneisiin molekyyleihin, joilla on isoelektrinen piste. Proteiinien nettovarauksen määrittää sen sivuketjuissa olevien aminohappojen positiivisten ja negatiivisten varausten summa. Yhdistelmäproteiinien nettovaraus riippuu sokeri- tai nukleiinihappopuolikkaista. Fosforylaation määrä vaikuttaa myös nettovaraukseen.³



Kuva 4. Kantaja-amfolyyttien kulkeutuminen sähkökentässä.³

Negatiivisen varauksen omaavat kantaja-amfolyytit kulkeutuvat kohti anodia ja positiivisesti varautuneet puolestaan kohti katodia sähkökentän kytkeytyessä päälle. Kuvassa 4 vasemmalla näkyy alkutilanne ennen aloitusta. Keskimmäisessä tilanteessa kantaja-amfolyytit ovat kulkeutumassa kohti omaa pI :nsä. Oikeanpuoleisessa tilanteessa molekyylit ovat kulkeutuneet omaan pI :nsä sähkökentässä. Nopeus riippuu varauksen suuruudesta. Sen vuoksi geelin anodipää on happamampi ja katodipää emäksisempi. Alhaisen pI :n omaavat amfolyytit kulkeutuvat kohti anodia ja korkean pI :n amfolyytit kulkeutuvat

kohti katodia, jota havainnollistetaan kuvassa 5. Muut amfolyytit asettuvat niiden väliin pI-arvon mukaisesti määrittäen geelissä vallitsevat pH-arvot, jolloin muodostuu asteittain nouseva pH-gradientti.³

Amfolyyttien pieni molekyylipaino takaa korkean diffuusionopeuden, jolloin ne diffundoituvat nopeasti ja jatkuvasti pois pI:stä kulkeutuen kuitenkin takaisin. Näin muodostuu tasainen pH-gradientti, vaikka käytettävissä olisi rajallinen määrä isomeerejä.⁴

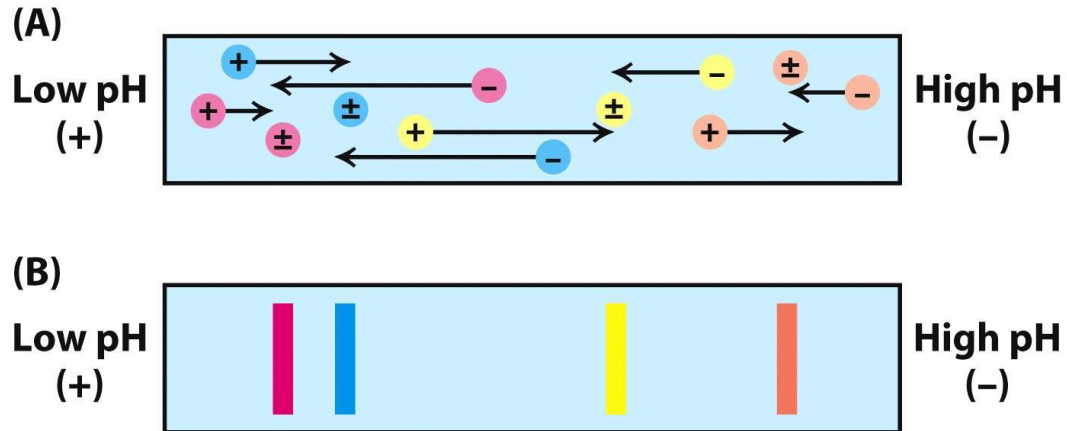
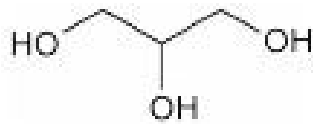


Figure 3.11
Biochemistry, Seventh Edition
 © 2012 W. H. Freeman and Company

Kuva 5. Kantaja-amfolyyttien kulkeutuminen sähkökentässä varaustensa mukaisesti.⁵

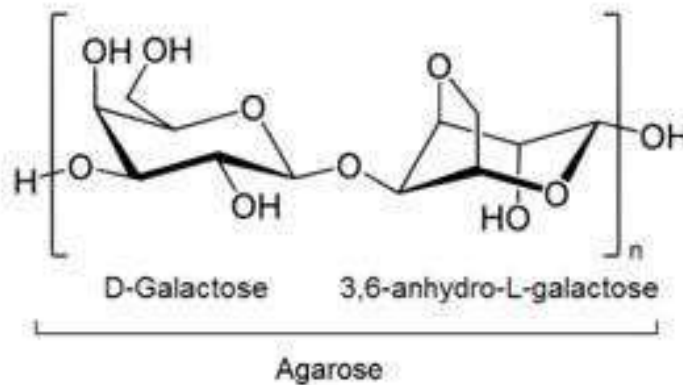
3.2 Geelien koostumus

Glyserolin tehtävänä on parantaa geelin mekaanisia ominaisuuksia ja pienentää elektroendo-osmoosia hygroskooppisten ominaisuuksiensa ansiosta. Se on kirkas, viskoosinen ja lähes väritön neste. Sen liukoisuus veteen ja hygroskooppiset ominaisuudet johtuvat glyserolin kolmesta hydrofiilisestä hydroksyyli ryhmästä. Glyserolia tuotetaan monin eri tavoin. Sitä saadaan esimerkiksi sivutuotteena öljyjen ja rasvojen saippuutumisesta sekä biodieselin valmistuksesta. Glyserolin rakennekaava kuvassa 6.⁶



Kuva 6. Glyserolin rakennekaava.⁶

Agaroosia käytetään sen geeliytymisominaisuuksiensa takia. Agaroosi on polysakkaridi koostuen vuorottelevista D-galaktoosista ja 3,6-anhydro-L-galaktoosista, mitkä muodostavat agarin rungon. D-galaktoosi muodostaa sidoksen C-1- ja C-3-hiilien ja 3,6-anhydro-L-galaktoosi C-2- ja C-4-hiilien kautta. Kahden monomeerin välisillä sidoksilla on toisistaan eroavat vastustuskyvyt kemialliseen ja entsymaattiseen hydrolyysiin. Entsyymit hydrolysoivat α -1,3-sidoksia helpommin ja happamat katalyytit hydrolysoivat helpommin β -1,4-sidoksia. Juurikin β -1,4-sisöä tekee agaroosista hyvin kompaktin ja vahvan yhdisteen. Agaroosin rakenne näkyy kuvassa 7.⁷



Kuva 7. Agaroosiin rakennekaava.⁸

Natriumatsidi (NaN_3) on natrium- ja kolmesta atsidi-ionista koostuva epäorgaaninen yhdiste. Sitä käytetään geeleissä bakteerien kasvua estävänä bakteriostaattisena säilöntäaineena. Se estää gram-negatiivisten ja joidenkin gram-positiivisten bakteerien kasvun.⁹

4 ANALYYSILAITTEEN TODENNUS VAIHEITTAIN

4.1 Käyttäjävaatimukset

User Requirement Specifications, URS, eli käyttäjävaatimukset määrittävät, mitä käyttäjä haluaa laitteen tekevän sekä käyttöolosuhteet, joissa laitetta käytetään. URS määrittelee vaatimukset, muttei toteutustapaa. URS-dokumentoinnissa pitää kuulua ”asiakkaan ääni” eli siinä tulee kuvailla mahdollisimman tarkkaan kootun informaation puitteissa asiakkaan tarpeet, kuitenkin välttämällä suunnitteluratkaisuja sekä liian teknistä terminologiaa. Validointi tehdään määritellyjä vaatimuksia vastaan.¹⁰

4.2 Karakterisointi

Käyttäjävaatimusten perusteella tehdään karakterisointisuunnitelma, joka löytyy liitteestä 1 (luottamuksellinen). Karakterisoinnissa päätettiin testata vesijäähdyttimen asetusnopeutta tavoitelämpötilaan sekä lämpötilan tasaisuutta yksikön keraamisessa laattassa ilman geelijoa. Lämpötila mitattiin myös geelistä ajon ollessa käynnissä lämpökameralla.

Geelijon sisältävissä testeissä keskityttiin karakterisoimaan vesijäähdyttimen lämpötilan, virtalähteen tehon nostamisen sekä ympäröivän lämpötilan nostamisen vaikutusta vyöhykkeiden ajautumiseen. Lisäksi testattiin, onko kolmen laitteen sarjaan kytkennällä erilaisuuksia eri valmistajien välillä.

4.3 Verifiointi

Verifiointi tarkoittaa tutkimukseen tai testaukseen perustuvaa varmistumista siitä, että laitteen kriittiset ominaisuudet ovat toistettavasti täyttäneet sille asetetut vaatimukset.¹¹

Tuotekehitysvaiheessa valmistetaan useampi laite, joista todennetaan laiteominaisuuksien ja toimintojen vaatimusten mukaisuus kuten tarkkuus/toistettavuus, ympäristöolosuhteiden vaikutus laitteen toimivuuteen, sähköturvallisuus, sähkömagneettisuus (EMC). Verifiointin päätteeksi kirjoitetaan tarvittavat valmistusohjeet ja laitekäsikirjat,

määritellään materiaalien ostotiedot, tarvittavat etikettitiedot, pakkaus- ja kuljetusmuodot. Kun laitteen on osoitettu toimivan teknisesti vaatimusten mukaisesti, suoritetaan vielä niin sanottu performance evaluation asiakkaan laboratorion kaltaisissa olosuhteissa. Tällöin laite asennetaan laboratorioon ja sillä ajetaan potilasnäytteitä etukäteen suunnitellun suunnitelman mukaisesti. Evaluaatiosta kirjoitetaan raportti, missä arvioidaan myös laitteen käytettävyyssominaisuudet analyttisen toiminnan lisäksi.¹²

4.4 Myytäväksi valmistuneen laitteen asennus ja käyttöönotto

Validoinnin tarkoituksena on todistaa dokumentoinnilla instrumentin soveltuvuus tarkoitukseensa. Validointiin kuuluu kolme vaihetta: suunnittelu, työn tekeminen ja raportointi. Suunnitelma sisältää kuvauksen validoinnin kohteesta, tulosten käsittelytavan sekä vaatimukset, joiden tulee täytyä. Työn tekemisessä edetään suunnitelman mukaan. Raportissa esitetään tulokset ja annetaan lausunto siitä, onko kohde validi. Validointiin kuuluu myös VMP eli validation master plan, joka on suunnitelma suunnitelmista. Sen avulla hallinnoidaan mitä validoidaan, missä validoidaan, milloin validoidaan sekä kuka validoi. VMP laaditaan harkiten ja huolella, mutta muutokset ovat silti mahdollisia.¹³

Laitteen validoinnissa suoritetaan kvalifiointi, jossa suunnitellaan ja testataan laitteen asennus sekä toiminta ja laaditaan kunnossapitosuunnitelma sekä kirjalliset käyttöohjeet. Kvalifioinnin vaiheisiin kuuluvat DQ, IQ, OQ sekä PQ. DQ eli design qualification pitää sisällään suunnitelmien tarkastuksen. DQ:ssa tarkastetaan vaatimukset laitteelle ja toimittajalle URS:n mukaisesti sekä varmistetaan, mitä vaatimuksia laitteen käyttäjä tarvitsee. DQ:ta seuraa IQ eli installation qualification, joka tarkoittaa asennus- ja vastaanottotarkastusta. IQ todentaa laitteen olevan suunnitelman ja spesifikaatioiden mukainen. Sillä osoitetaan, että laite on asennettu oikein ja oikeanlaiseen ympäristöön. Sen toimintoihin kuuluvat sijoitus, tulotarkastus, asennus ohjeiden mukaan ja todetaan laitteen olevan toimintakunnossa. Sen jälkeen määritellään ja nimetään laitteen osat ja mittalaitteet. Laitteen osille annetaan tunnistetieto, esimerkiksi ID-numero.¹³

Kolmas vaihe on OQ eli operational qualification, jolla tarkoitetaan toiminnan testausta. OQ:ssa arvioidaan täyttäväkö laite sille asetetut vaatimukset käyttöympäristössään ja osoitetaan laitteen toimivan niin kuin sen pitäisi. Tässä vaiheessa viimeistään tarkastetaan ja hyväksytään laitteistoon liittyvät ohjeet kalibroinnista, valvonnasta, huollosta, kunnossapidosta sekä puhdistuksesta. Viimeinen kvalifioinnin vaihe on PQ eli performance qualification, jossa testataan suorituskyky. PQ:ssa laite on siirretty normaalikäyttöön ja siinä

todennetaan laitteen toimivan kokonaisuudessaan aiotussa käyttötarkoituksessa toistettavasti ja uusittavasti. Tässä vaiheessa noudatetaan huolto- ja kalibrointiohjelmaa sekä testataan säännöllisesti toimintaa analyysiolosuhteissa.¹³

5 MATERIAALIT JA MENETELMÄT

Karakterisointi aloitettiin laatimalla aluksi karakterisointisuunnitelma, joka kuitenkin vaihtui soveltuvuustutkimukseksi. Soveltuvuustutkimus löytyy liitteestä 2 (luottamuksellinen). Karakterisoinnin ja soveltuvuustutkimuksen testinumeroinnit ovat liitteessä 3 (luottamuksellinen).

Taulukko 3. Tarvittavat materiaalit ja liuokset testien tekemiseen.

Materiaali	Lot.	Viimeinen käyttöpäivä
Neonatal Hemoglobin Agarose IEF Gel (large)	656760 (lot 1)	2018-09
Neonatal Hemoglobin Agarose IEF Gel (large)	655266 (lot 2)	2018-07
Neonatal Hemoglobin Agarose IEF Gel (large)	653226 (lot 3)	2018-04
Neonatal Hemoglobin Agarose IEF Gel (large)	654225 (lot 4)	2018-05
Neonatal Hemoglobin Agarose IEF Gel (large)	654183 (lot 5)	2018-05
Neonatal Hemoglobin Agarose IEF Gel (large)	654226 (lot 6)	2018-05
Hemoglobin Agarose IEF Gel (small)	655136 (lot 1)	2018-11
Hemoglobin Agarose IEF Gel (small)	653873 (lot 2)	2018-09
Anode Solution	651803	2018-04
Cathode Solution	647272	2017-11
Hb Elution Solution	645878	2017-07
Electrode wicks	654033	2021-08
Blotting paper	647633	2019-04

Taulukko 4. Testeissä käytetyt kontrollit ja muut näytteet:

Kontrolli/näyte	Lot.	Viimeinen käyttöpäivä
extendSURE™ Hemoglobin FASC control (Hb 610)	6027	2020-02-29
Hb AFSC control	2000179427	16.8.2018
Hb FAS control	2000178241	11.11.2018
A-bloodspot	650955	2018-10

Taulukko 5. Testeissä käytetyt IEF-yksiköt, vesijäähdyttimet ja virtalähteet. Koodit au-
kaistuna liitteessä 4 (luottamuksellinen).

IEF-yksikkö	Jäähdytin	Virtalähde
A1	C1	E1
A2	D1	E2
A3	C2	E3
A4	C2	E4
A5	C2	E5
B1	D2	E6
B2	D2	E7
B3	D2	E6
B4	D2	E8

IEF-ajon valmistelu aloitettiin lävistämällä mikrotiiterilevylle tarvittava määrä 3,2 mm täpliä kuivatusta A-verinäytteestä, joita eluoiitiin 25 µl Elution Solutionia (Wallac, Turku, Suomi). Näytteiden lävistämiseen käytettiin joko käsilävistintä tai DBS Punchrer -instrumenttia. Täpliä eluoiitiin 40 minuuttia. AFSC- ja FAS-kontrollit rekonstituoitiin pipetoimalla pulloihin 1 ml Elution Solutionia (Wallac, Turku, Suomi), jonka jälkeen niitä seisotettiin 30 minuuttia huoneenlämmössä. Sen jälkeen niitä sekoitettiin varovasti vortexilla. Hb 610 – kontrolli rekonstituoitiin pipetoimalla 2,5 ml eluointiliuosta ja annettiin sen seistä huoneenlämmössä 15 minuuttia. Sekoitettiin sen jälkeen varovasti vortexilla. Kontrolli

sisältää Hemoglobiinit A, F, S ja C. Kontrollia voi pitää 30 minuuttia kerrallaan huoneenlämmössä rekonstituution jälkeen. Rekonstituution jälkeen kontrollit säilyvät kuusi viikkoa 4 °C kylmähuoneessa. A-verinäytteet pitää eluoida aina ennen ajoa. ^{14,15,16}

Kiinnitysliuksena käytetty 10% TCA-liuos (trikloorietikkahappo) valmistettiin liuottamalla 500 g TCA:ta 5000 ml:n kiertolinjaveteen. Jokaiseen geeliin tarvittiin 200 ml valmistettua liuosta. ¹⁵

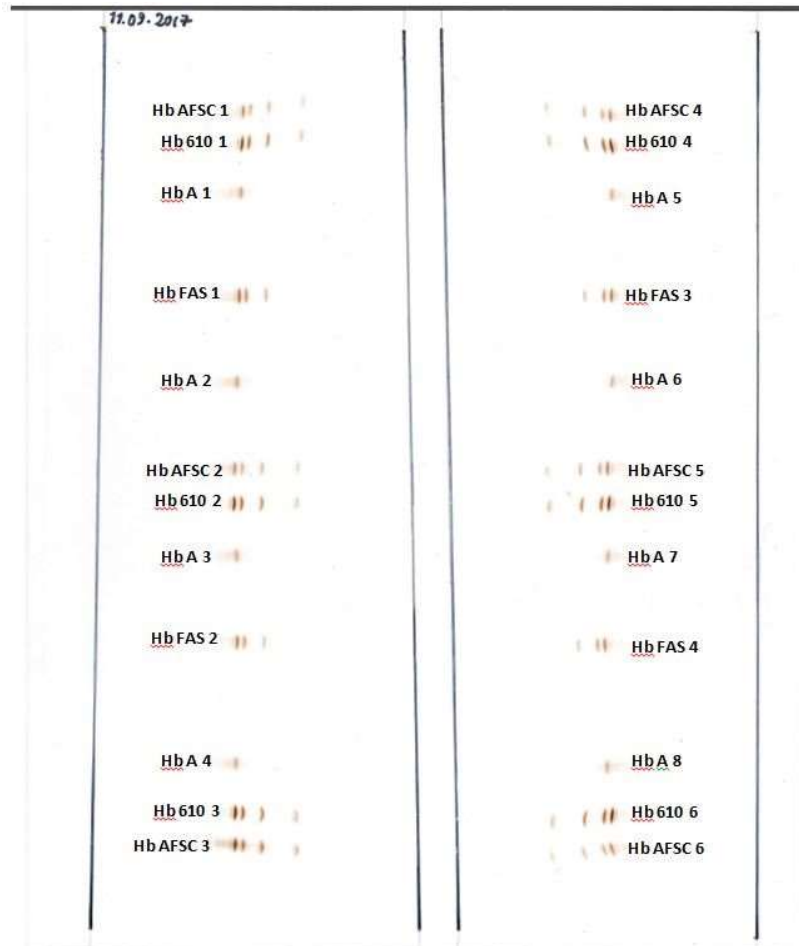
5.1 Geelijaio

Geelijaio aloitettiin käynnistämällä vesijäähdytin n. 40 minuuttia ennen ajoa. Lämpötiloina käytettiin 8 °C, 10 °C ja 14 °C. Seuraavaksi pipetoitiin MilliQ-vettä 2 ml ajopöydälle, jonka päälle geeli (Wallac, Turku, Suomi) aseteltiin geelipuoli ylöspäin. Pieniä geelejä ajettaessa pipetoitiin 1 ml MilliQ-vettä. Geelistä paineltiin ilmakuplat pois ja ylimääräinen vesi kuivattiin imupaperin avulla pois. Ylimääräinen vesi kuivattiin nukkaantumattomalla paperilla pois geelin ympäriltä oikosulkujen ja kipinäinnin estämiseksi. ¹⁵

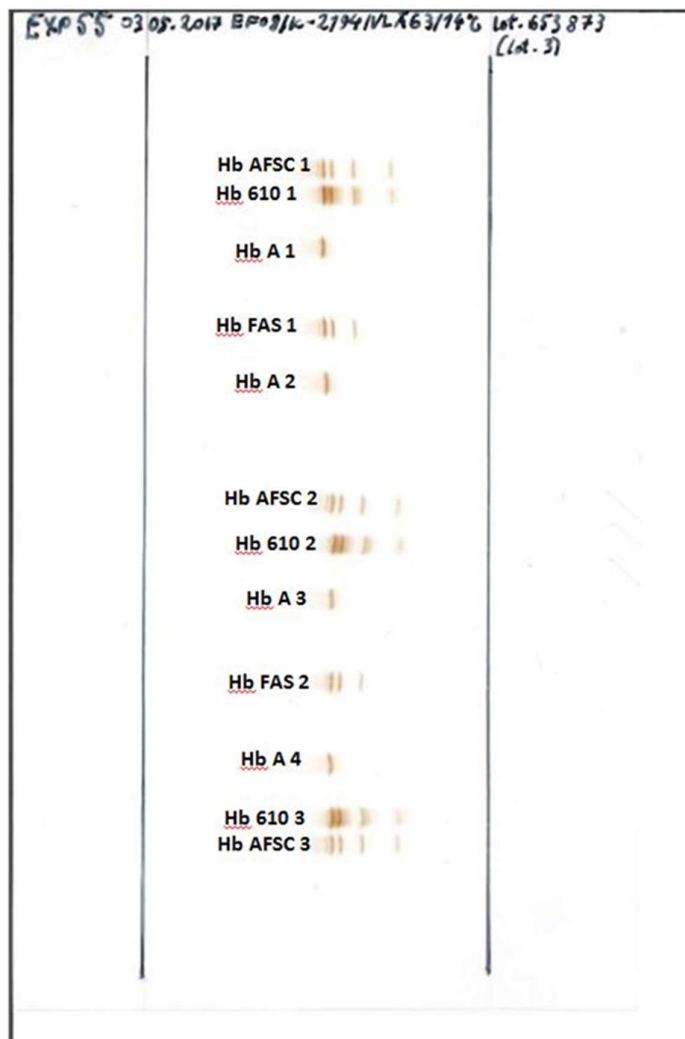
Seuraavaksi asetettiin kaksi johdinliuskaa karkea puoli alaspäin puhtaalle paperipyyhkeelle ja pipetoitiin 4 ml Anode Solutionia (Wallac, Turku, Suomi) niiden päälle. Kuivattiin ylimääräinen neste pois paperilla ja laitettiin yksi johdinliuska geelin molemmille puolille pitkää sivua pitkin. Seuraavaksi asetettiin yksi johdinliuska paperipyyhkeelle karkea puoli alaspäin ja pipetoitiin 4 ml Cathode Solutionia (Wallac, Turku, Suomi) sen päälle. Kuivattiin ylimääräinen neste pois ja asetettiin se geelin keskelle 8 cm päähän anodiliuskoista. Pieniä geelejä valmisteltaessa ajoon pipetoitiin 4 ml Anode Solutionia (Wallac, Turku, Suomi) anodiliuskan päälle ja 4 ml Cathode Solutionia (Wallac, Turku, Suomi) katodiliuskan päälle. Pieneen geeliin tuli vain kaksi liuskaa, jotka asetettiin 7 cm päähän toisistaan. ^{14,15}

Liuskosten laittamisen jälkeen asetettiin kaksi 44 kaivon templaattia katodiliuskan kummallekin puolelle. Kutakin kontrollia pipetoitiin 5 µl templaatin eri kaivoihin kuvan 8 mukaisesti. Hb 610 –kontrollia pipetoitiin kummallekin puolelle AFSC-kontrollin ja A-veritäplän väliin. Kaksi ensimmäistä Hb 610 –kontrollia pipetoitiin AFSC-kontrollin alapuolelle ja kolmas sen yläpuolelle. ^{14,15}

Liuskojen laittamisen jälkeen pienen geelin päälle asetettiin 25 kaivon templaatti katodiliuskan sivulle. Kutakin kontrollia pipetoitiin 5 µl templaatin eri kaivoihin kuvan 9 mukaisesti, pieneen geelin vain yhden puolen kontrollit. Hb 610 –kontrollia pipetoitiin AFSC-kontrollin ja A-veritäplän väliin. Kaksi ensimmäistä Hb 610 –kontrollia pipetoitiin AFSC-kontrollin alapuolelle ja kolmas sen yläpuolelle.^{14,15}



Kuva 8. Kontrollien pipetoimisjärjestys isolle geelille.



Kuva 9. Kontrollien pipetoimisjärjestys pienelle geelille.

Kontrollien pipetoimisen jälkeen laskettiin kansi ajopöydän päälle niin, että elektrodit koskettivat tasaisesti kaikkien johdinliuoskojen keskiosaa kannen ollessa alhaalla. Kytettiin johdot virtalähteeseen ja valittiin haluttu ajo-ohjelma. ^{14,15}

Taulukko 6. Geelien ajo-olosuhteet.

Tutkimuksen kohta	Teho (W)	Max jännite (V)	Virta (mA)	Aika (min)
4.2.1-4.2.2. 4.2.4-4.2.5.	30	1200	100	110
4.2.3.	40	1200	100	110

Ajo-ohjelman valitsemisen jälkeen kytkettiin virta päälle. Ajo pysäytettiin 10 minuutin välein lämpökamerakuvaa varten. 20 minuutin kohdalla otettiin templaatit pois ja kuivattiin geeliä imupaperilla. Geeliä kuivattiin myös vähintään 60 minuutin ja 90 minuutin kohdalla. Pieni geeli kuivattiin vain 40 minuutin kohdalla. Fokusoinnin jälkeen tehtiin saksilla pienet viillot johdinliuoskojen kohdalle elektrodien paikan merkitsemiseksi ennen niiden poistamista.^{14,15}

Fokusoinnin jälkeen geelit laitettiin astiaan ja kaadettiin ison geelin päälle 200 ml ja pienen geelin päälle 100 ml 10 % TCA-liuosta vyöhykkeiden kiinnittämistä varten. Geelin annettiin olla 10 minuuttia tasosekoituksessa. Kiinnitysliuos kaadettiin jäteastiaan ja sen tilalle kaadettiin 200 ml joko kiertolinja- tai MilliQ-vettä riippuen kumpaa oli saatavilla. Vesi vaihdettiin 30 min päästä. Huuhtelun jälkeen geelin annettiin kuivua yön yli paperipyyhkeiden päällä.¹⁴

5.2 Vyöhykkeiden mittaaminen ja tunnistus

Geelien kuivuttua piirrettiin tussilla viiltojen kohdalle johdinliuoskojen tarkistusviivat elektrodien välisen etäisyyden mittaamiseksi. Lisäksi geelien yläosaan kirjoitettiin testi- eli exp-numero, päivämäärä, käytetty ajolaitteisto sekä geelin eränumero. Vyöhykkeet mitattiin laadunvalvonnan kriteerien mukaan kalibroitua työntömittaa käyttäen ylhäältä alas aina vasen puoli ensimmäisenä.¹⁵

Hb F:n kulkeutumista katodilta verrattiin elektrodien välisen etäisyyden puoleenväliin AFCS- sekä Hb 610- kontrollissa. Se sai poiketa enintään ± 6 mm. Seuraavaksi mitattiin Hb A1 C:n ja Hb C:n välistä eroa sekä AFSC- että Hb 610 – kontrollissa, minkä piti olla ≥ 15 mm. Kolmantena mitattiin Hb A:n ja Hb F:n välistä eroa FAS-kontrollissa, minkä piti olla $\geq 1,5$ mm. Viimeisenä mitattiin Hb A:n ja Hb Fac:n välistä eroa FAS-kontrollissa.

Laadunvalvontakriteerien lisäksi mitattiin kaikkien Hb A:n etäisyydet katodilta karakterisointidataa varten, jotta pystyttiin selvittämään kuinka tasaisesti ne ovat kulkeutuneet kussakin geelissä.

Vyöhykkeiden kulkemista matkoista laskettiin keskiarvo (\bar{x}), keskihajonta (s) ja suhteellinen keskihajonta (RSD-%).

Keskiarvo lasketaan kaavalla:

$$\bar{x} = \frac{x_1 + x_2 + x_3 \dots + x_n}{n}$$

x_n = havainnon lukuarvo

n = havaintojen lukumäärä¹⁷

Keskihajonta lasketaan kaavalla:

$$s = \sqrt{\frac{(x_i - \bar{x})^2}{n - 1}}$$

n = havaintojen lukumäärä

x_i = laskettavan havainnon arvo

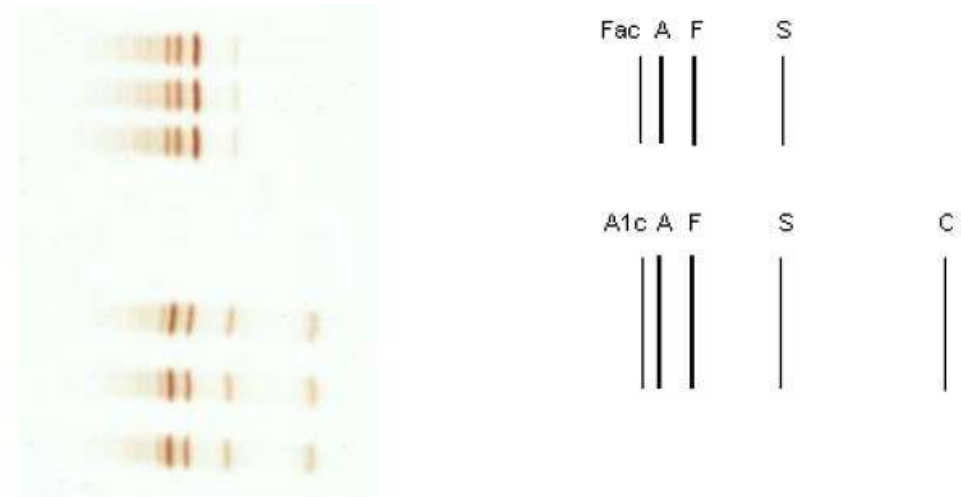
\bar{x} = keskiarvo¹⁷

Suhteellinen keskihajonta lasketaan kaavalla:

$$RSD - \% = \frac{s}{\bar{x}} \times 100$$

s = keskihajonta

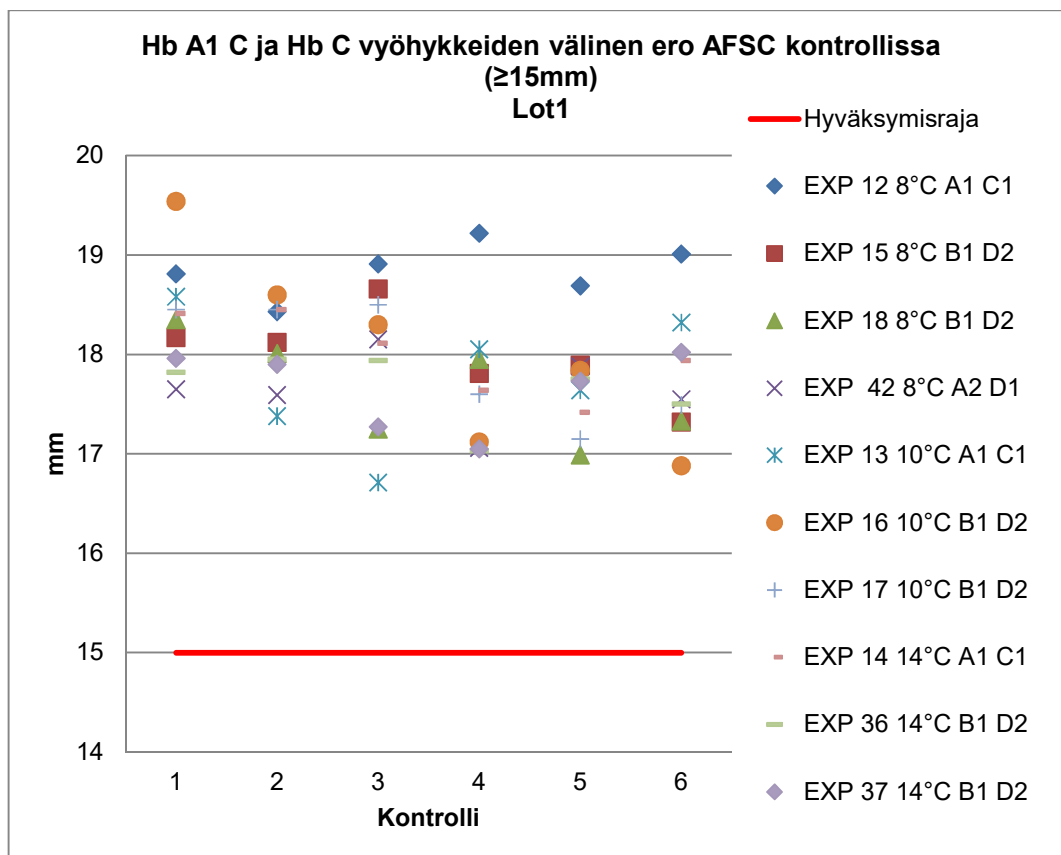
\bar{x} = keskiarvo¹⁷



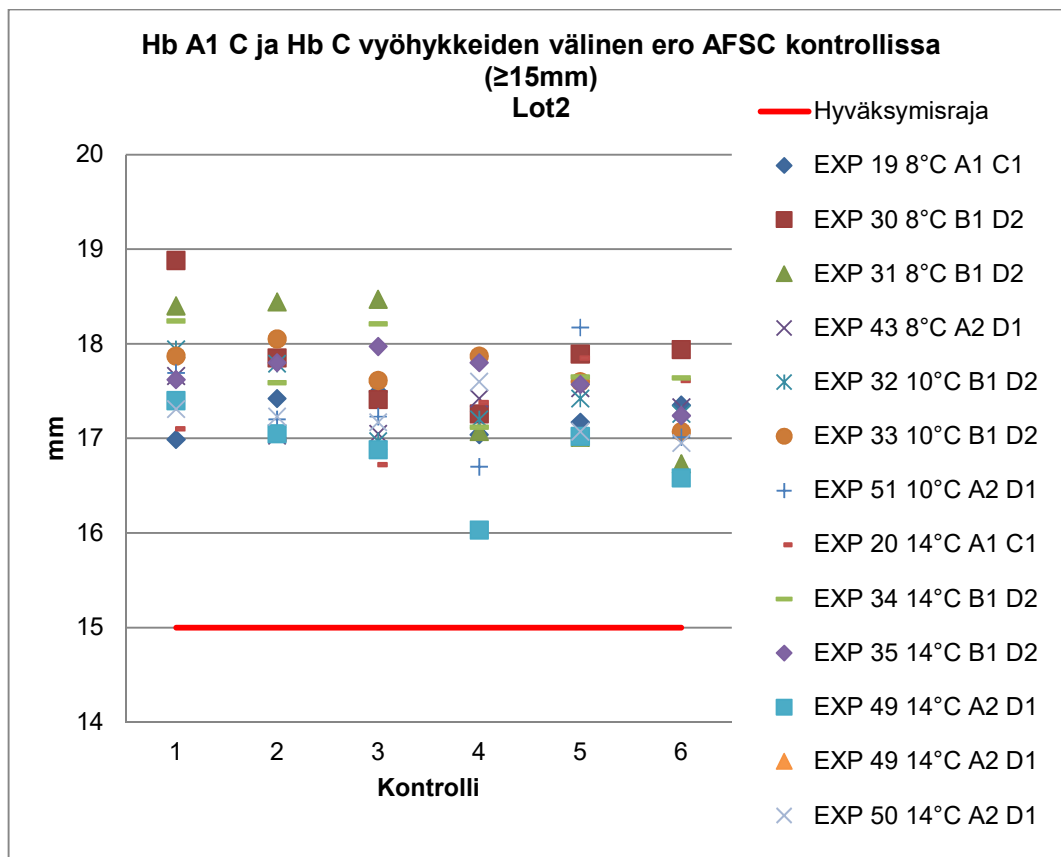
Kuva 10. Vyöhykkeiden kulkeutuminen.¹⁵

6 TULOKSET

6.1 Eri lämpötilat



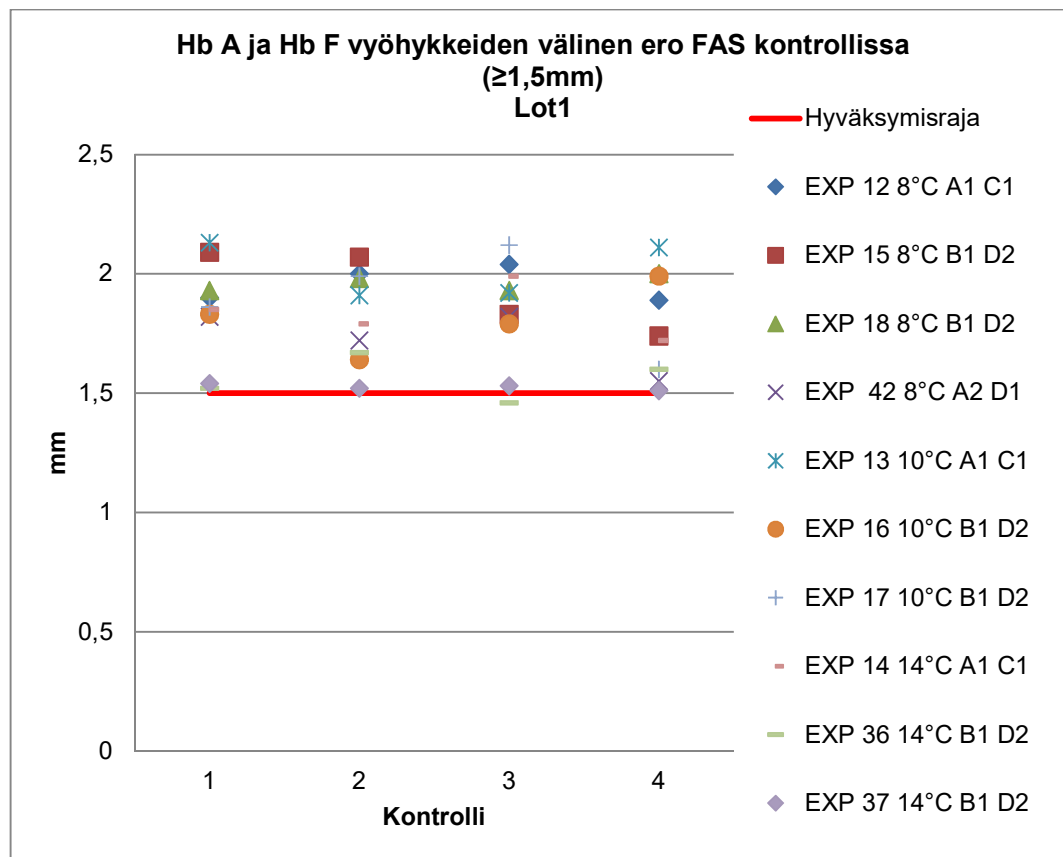
Kuva 11. Hb A1 C ja Hb C vyöhykkeiden välinen ero AFSC-kontrollissa (hyväksymisraja ≥ 15.0 mm).



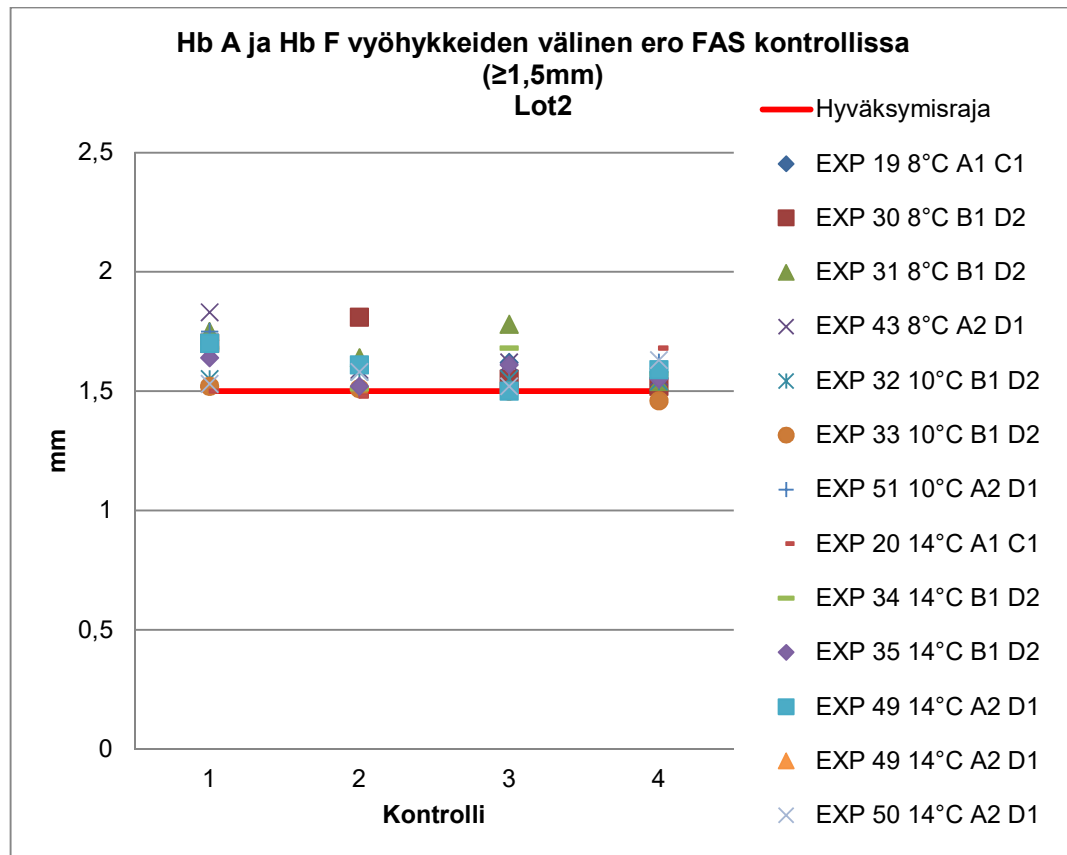
Kuva 12. Hb A1 C ja Hb C vyöhykkeiden välinen ero AFSC-kontrollissa (hyväksymisraja ≥ 15.0 mm).

Taulukko 7. Tulokset Hb A1 C ja Hb C välisistä eroista AFSC-kontrollissa eri lämpötiloilla.

EXP	Lämpötila (°C)	Keskiarvo (mm)	Keskihajonta (mm)	RSD (%)
EXP 12	8	18,80	0,27	1,45
EXP 15	8	18,00	0,44	2,47
EXP 18	8	17,60	0,53	3,01
Exp 42	8	17,60	0,36	2,07
EXP 19	8	17,20	0,21	1,20
EXP 30	8	17,90	0,57	3,17
EXP 31	8	17,70	0,83	4,69
EXP 43	8	17,30	0,26	1,47
EXP 13	10	17,80	0,68	3,83
EXP 16	10	18,00	0,99	5,48
EXP 17	10	17,90	0,60	3,33
EXP 32	10	17,40	0,37	2,12
EXP 33	10	17,70	0,34	1,94
EXP 51	10	17,30	0,52	3,02
EXP 14	14	18,00	0,41	2,29
EXP 36	14	17,70	0,35	1,99
EXP 37	14	17,70	0,40	2,27
EXP 20	14	17,30	0,42	2,42
EXP 34	14	17,70	0,42	2,39
EXP 35	14	17,70	0,25	1,43
EXP 49	14	16,80	0,47	2,81
EXP 50	14	17,20	0,22	1,30



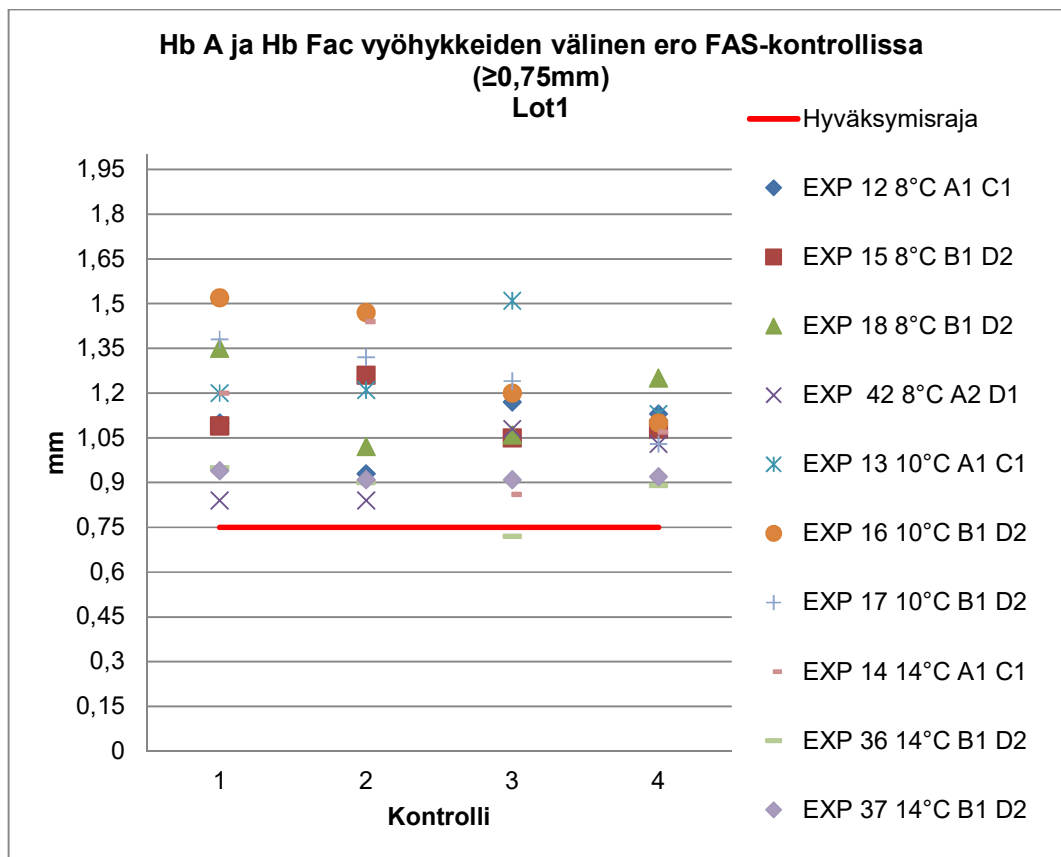
Kuva 13. Hb A ja Hb F vyöhykkeiden välinen ero FAS-kontrollissa (hyväksymisraja ≥ 1.5 mm).



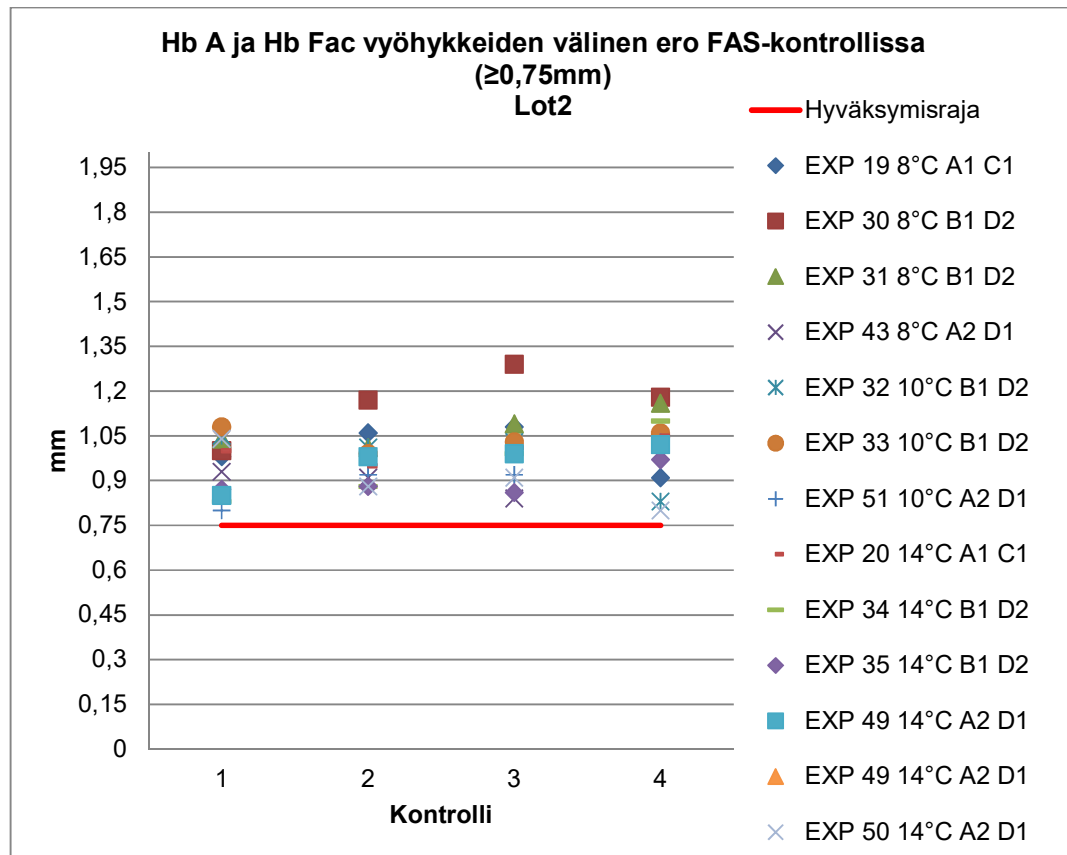
Kuva 14. Hb A ja Hb F vyöhykkeiden välinen ero FAS-kontrollissa (hyväksymisraja ≥ 1.5 mm).

Taulukko 8. Tulokset Hb A ja Hb F välisistä eroista FAS-kontrollissa eri lämpötiloilla.

EXP	Lämpötila (°C)	Keskiarvo (mm)	Keskihajonta (mm)	RSD (%)
EXP 12	8	2,00	0,07	3,71
EXP 15	8	1,90	0,17	9,18
EXP 18	8	2,00	0,04	1,78
EXP 42	8	1,70	0,13	7,49
EXP 19	8	1,60	0,04	2,62
EXP 30	8	1,60	0,14	8,45
EXP 31	8	1,70	0,11	6,45
EXP 43	8	1,70	0,12	7,20
EXP 13	10	2,00	0,12	5,94
EXP 16	10	1,80	0,14	7,99
EXP 17	10	1,90	0,22	11,69
EXP 32	10	1,60	0,02	1,08
EXP 33	10	1,50	0,03	1,75
EXP 51	10	1,60	0,10	6,15
EXP 14	14	1,80	0,11	6,37
EXP 36	14	1,60	0,09	5,74
EXP 37	14	1,50	0,01	0,86
EXP 20	14	1,50	0,09	6,10
EXP 34	14	1,60	0,08	5,28
EXP 35	14	1,60	0,05	3,42
EXP 49	14	1,60	0,08	5,13
EXP 50	14	1,60	0,05	3,17



Kuva 15. Hb A ja Hb Fac vyöhykkeiden välinen ero FAS-kontrollissa (hyväksymisraja $\geq 0.75\text{ mm}$).

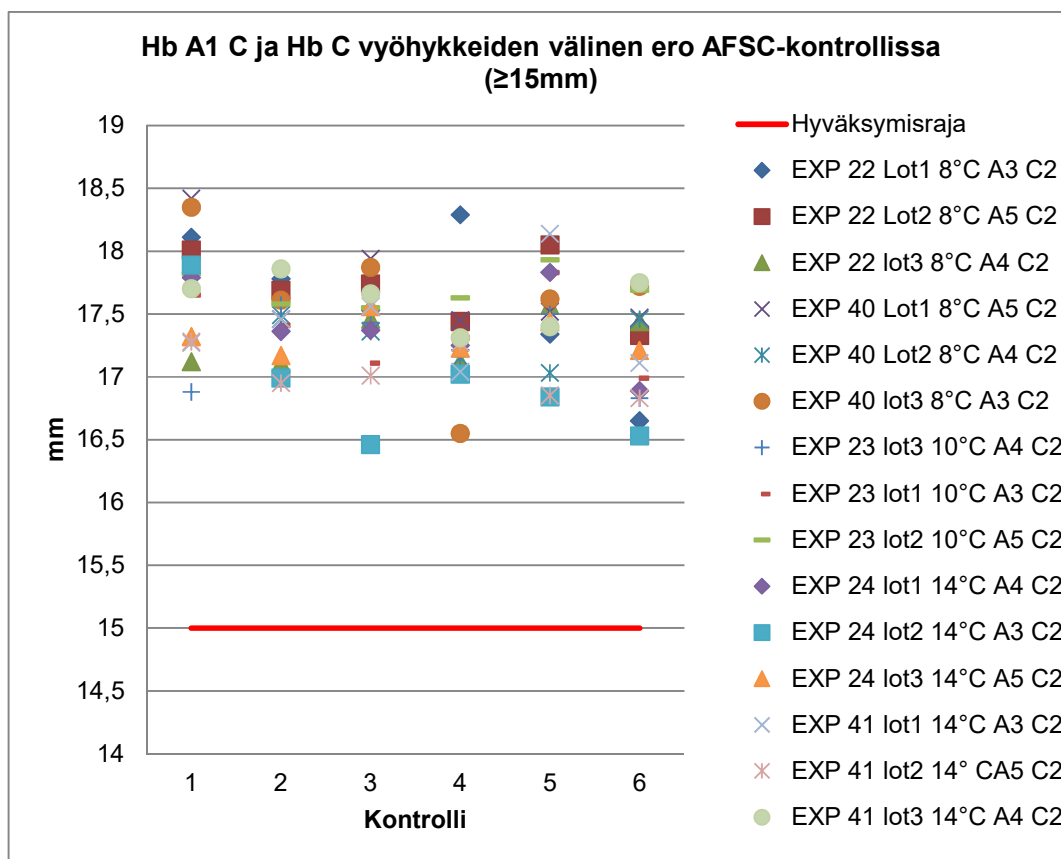


Kuva 16. Hb A ja Hb Fac vyöhykkeiden välinen ero FAS-kontrollissa (hyväksymisraja $\geq 0.75\text{ mm}$).

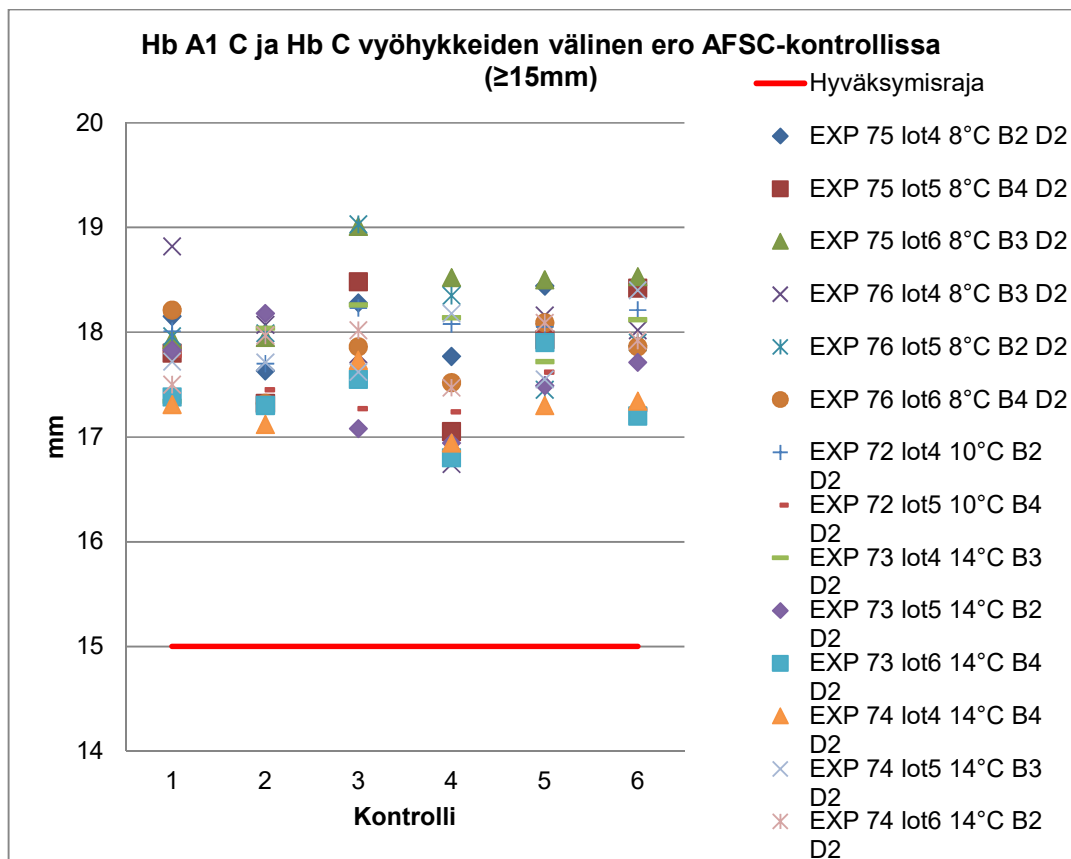
Taulukko 9. Tulokset Hb A ja Hb Fac välisistä eroista FAS-kontrollissa eri lämpötiloissa.

EXP	Lämpötila (°C)	Keskiarvo (mm)	Keskihajonta (mm)	RSD (%)
EXP 12	8	1,08	0,11	9,78
EXP 15	8	1,12	0,09	8,47
EXP 18	8	1,17	0,16	13,37
Exp 42	8	0,95	0,13	13,24
EXP 19	8	1,01	0,08	7,73
EXP 30	8	1,16	0,12	10,32
EXP 31	8	1,08	0,07	6,07
EXP 43	8	0,93	0,08	8,44
EXP 13	10	1,26	0,17	13,40
EXP 16	10	1,32	0,20	15,48
EXP 17	10	1,24	0,15	12,33
EXP 32	10	0,98	0,10	10,34
EXP 33	10	1,04	0,04	3,77
EXP 51	10	0,92	0,09	10,21
EXP 14	14	1,14	0,24	21,30
EXP 36	14	0,87	0,10	11,51
EXP 37	14	0,92	0,01	1,54
EXP 20	14	1,00	0,04	4,11
EXP 34	14	0,95	0,12	12,66
EXP 35	14	0,90	0,05	5,63
EXP 49	14	0,96	0,08	7,84
EXP 50	14	0,91	0,10	10,97

6.2 Kolme yksikköä sarjassa



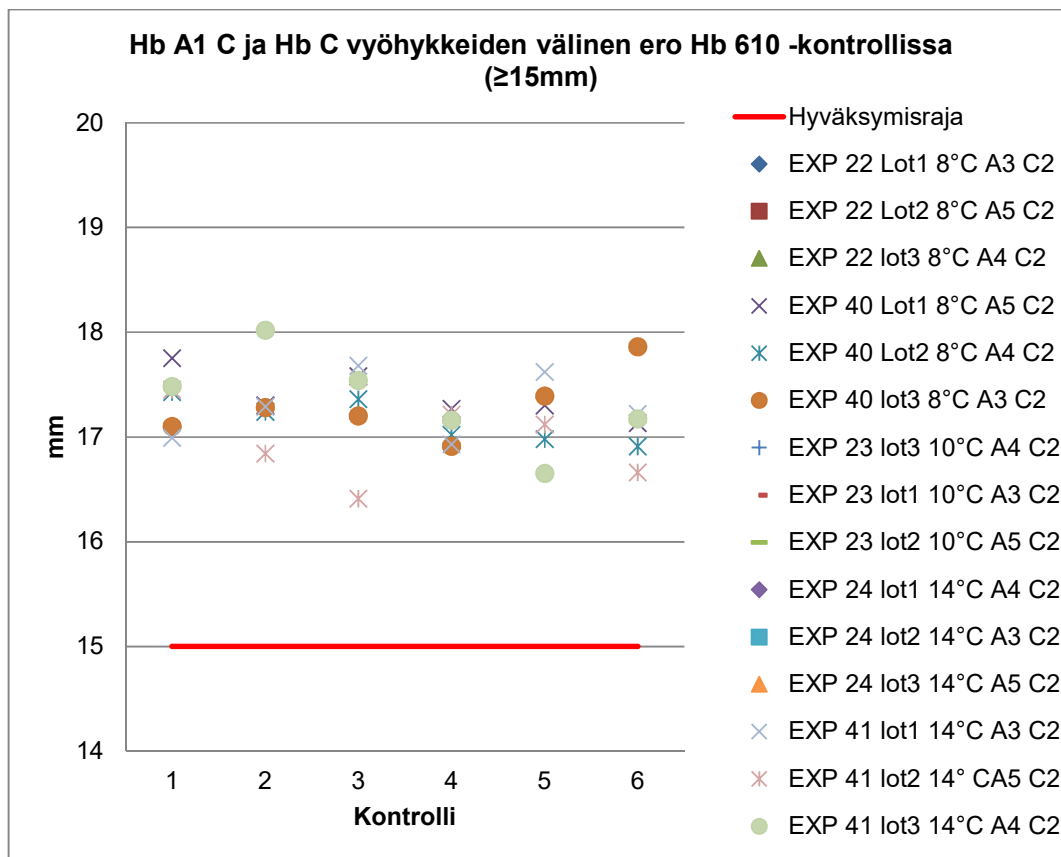
Kuva 17. Hb A1 C ja Hb C vyöhykkeiden välinen ero AFSC-kontrollissa (hyväksymisraja ≥ 15.0 mm).



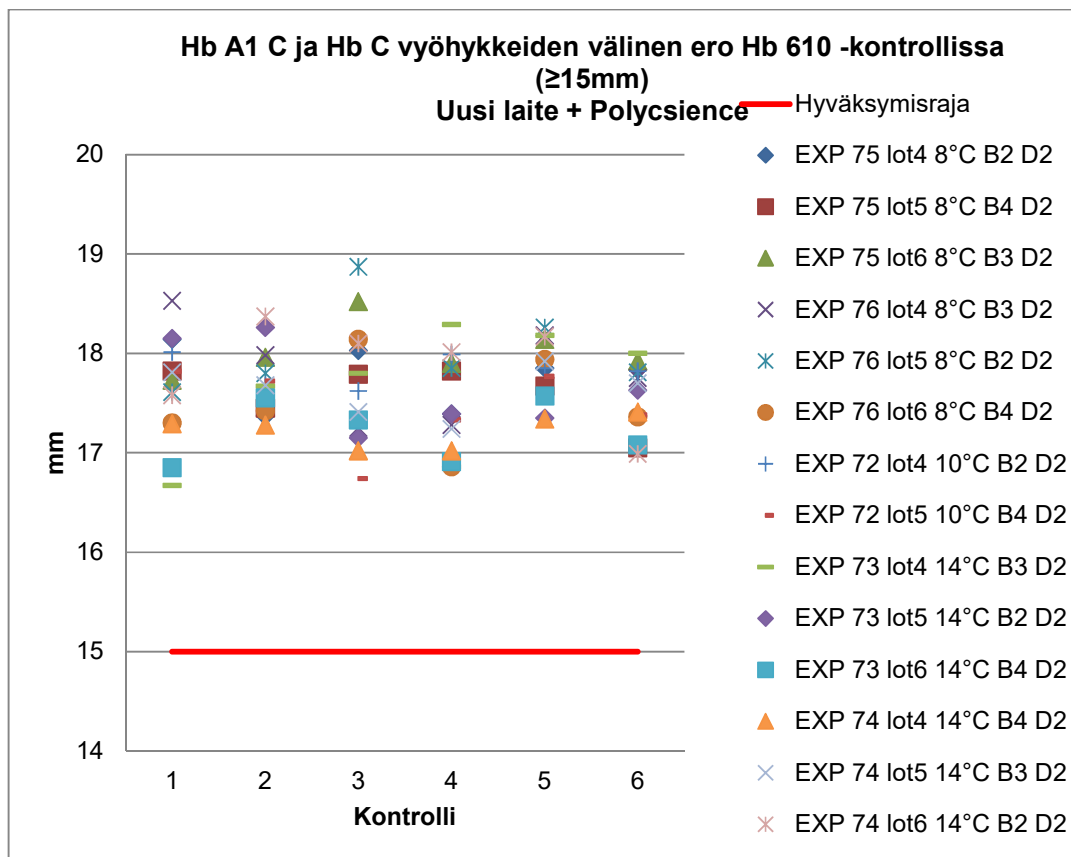
Kuva 18. Hb A1 C ja Hb C vyöhykkeiden välinen ero AFSC-kontrollissa (hyväksymisraja ≥ 15.0 mm).

Taulukko 10. Tulokset Hb A1 C ja Hb C välisistä eroista AFSC-kontrollissa kolmen yksikön sarjassa.

EXP	Lämpötila (°C)	Keskiarvo (mm)	Keskihajonta (mm)	RSD (%)
EXP 22	8	17,60	0,59	3,35
EXP 22	8	17,70	0,29	1,65
EXP 22	8	17,30	0,21	1,21
EXP 40	8	17,70	0,40	2,23
EXP 40	8	17,40	0,29	1,65
EXP 40	8	17,60	0,59	3,36
EXP 23	10	17,20	0,32	1,87
EXP 23	10	17,40	0,32	1,83
EXP 23	10	17,70	0,15	0,83
EXP 24	14	17,40	0,35	2,02
EXP 24	14	17,00	0,51	3,02
EXP 24	14	17,30	0,15	0,88
EXP 41	14	17,40	0,40	2,30
EXP 41	14	17,00	0,20	1,17
EXP 41	14	17,60	0,21	1,21
EXP 75	8	18,00	0,32	1,75
EXP 75	8	17,80	0,57	3,23
EXP 75	8	18,40	0,41	2,22
EXP 76	8	17,90	0,68	3,80
EXP 76	8	18,10	0,53	2,94
EXP 76	8	17,80	0,34	1,89
EXP 72	10	18,00	0,19	1,06
EXP 72	10	17,40	0,22	1,28
EXP 73	14	17,90	0,34	1,92
EXP 73	14	17,50	0,47	2,68
EXP 73	14	17,40	0,37	2,10
EXP 74	14	17,30	0,26	1,52
EXP 74	14	17,90	0,34	1,92
EXP 74	14	17,80	0,27	1,53



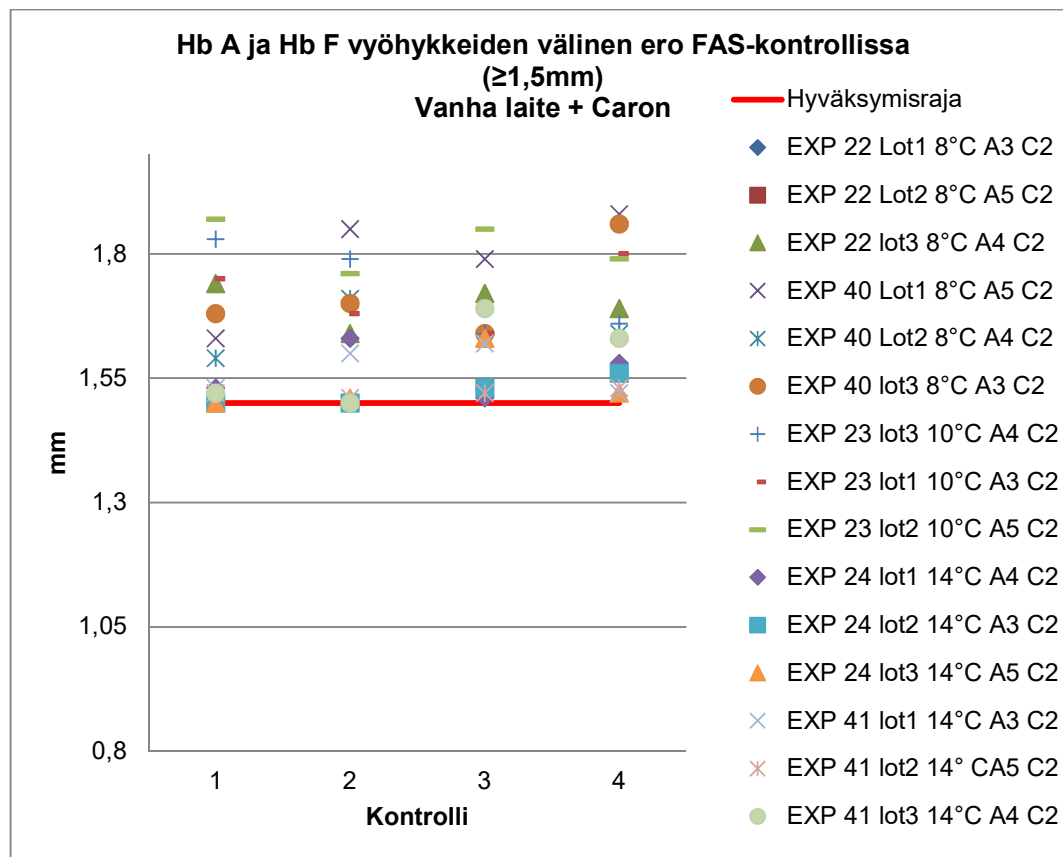
Kuva 19. Hb A1 C ja Hb C vyöhykkeiden välinen ero Hb 610 -kontrollissa (hyväksymisraja ≥ 15.0 mm).



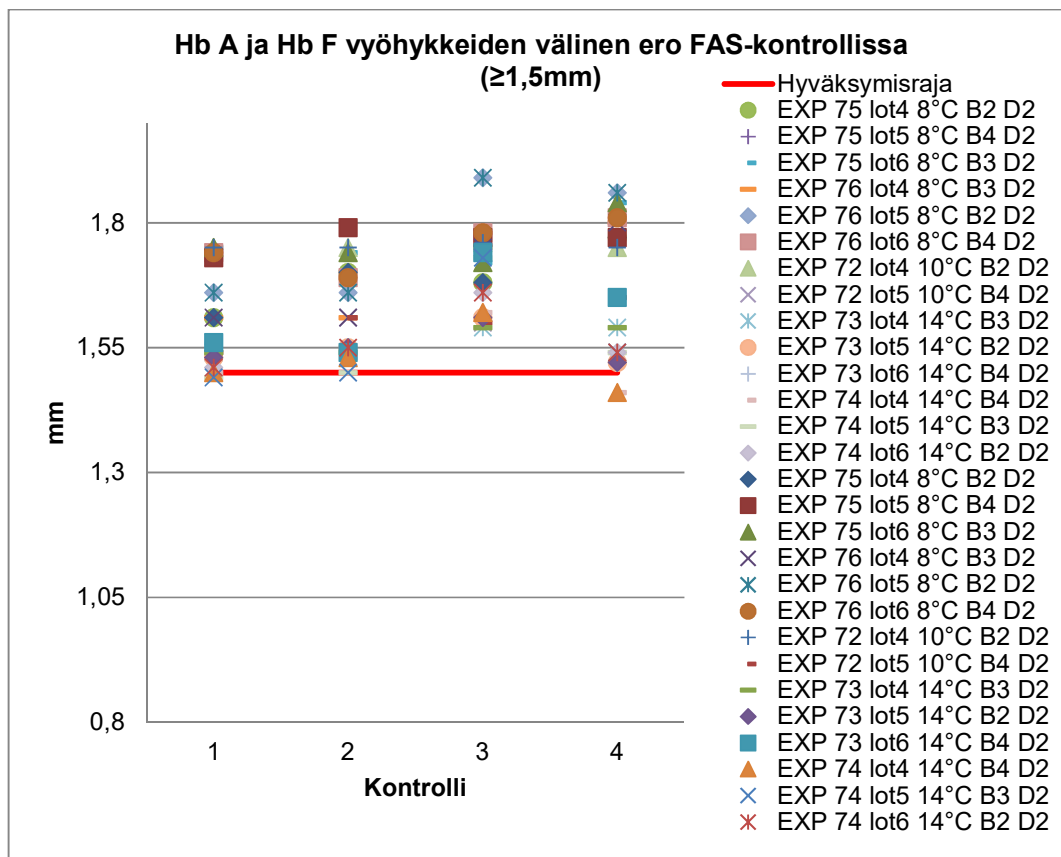
Kuva 20. Hb A1 C ja Hb C vyöhykkeiden välinen ero Hb 610 -kontrollissa (hyväksymisraja ≥ 15.0 mm).

Taulukko 11. Tulokset Hb A1 C ja Hb C välisistä eroista Hb 610-kontrollissa kolmen yksikön sarjassa.

EXP	Lämpötila (°C)	Keskiarvo (mm)	Keskihajonta (mm)	RSD (%)
EXP 40	8	17,40	0,23	1,32
EXP 40	8	17,20	0,22	1,26
EXP 40	8	17,30	0,32	1,87
EXP 41	14	17,30	0,31	1,80
EXP 41	14	16,90	0,38	2,27
EXP 41	14	17,30	0,46	2,66
EXP 75	8	17,80	0,32	1,81
EXP 75	8	17,60	0,30	1,73
EXP 75	8	18,00	0,27	1,52
EXP 76	8	17,80	0,51	2,84
EXP 76	8	18,00	0,46	2,57
EXP 76	8	17,50	0,46	2,65
EXP 72	10	17,80	0,16	0,89
EXP 72	10	17,50	0,41	2,34
EXP 73	14	17,80	0,59	3,29
EXP 73	14	17,70	0,45	2,56
EXP 73	14	17,20	0,31	1,83
EXP 74	14	17,20	0,17	0,97
EXP 74	14	17,60	0,25	1,45
EXP 74	14	17,90	0,50	2,82



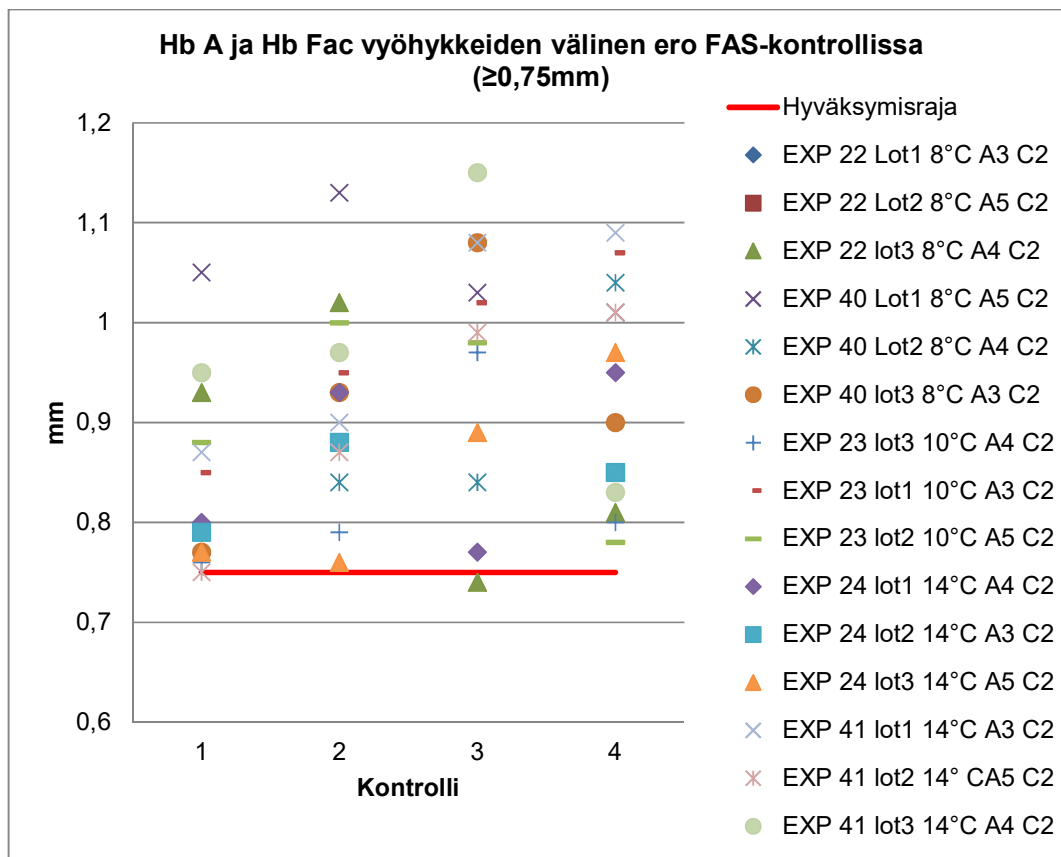
Kuva 21. Hb A ja Hb F vyöhykkeiden välinen ero FAS-kontrollissa (hyväksymisraja ≥ 1.5 mm).



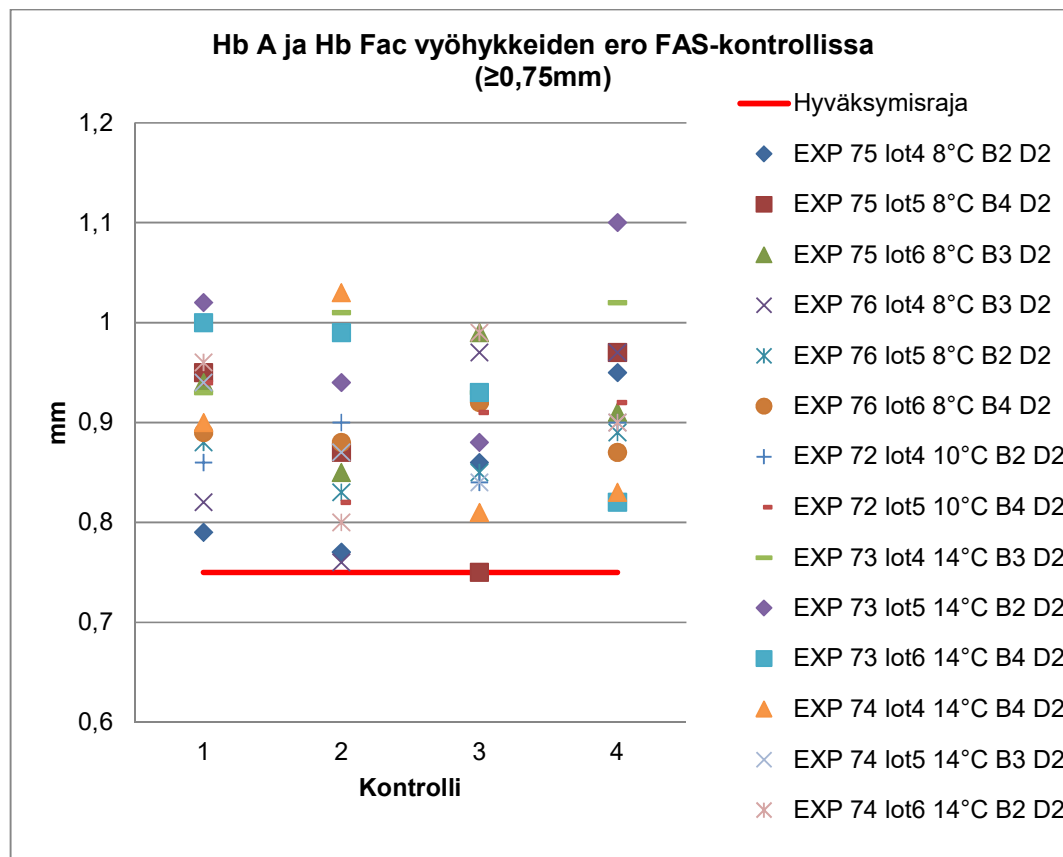
Kuva 22. Hb A ja Hb F vyöhykkeiden välinen ero FAS-kontrollissa (hyväksymisraja ≥ 1.5 mm).

Taulukko 12. Tulokset Hb A ja Hb F välisistä eroista FAS-kontrollissa kolmen yksikön sarjassa.

EXP	Lämpötila (°C)	Keskiarvo (mm)	Keskihajonta (mm)	RSD (%)
EXP 22	8	1,70	0,04	2,56
EXP 40	8	1,80	0,11	6,19
EXP 40	8	1,60	0,05	3,12
EXP 40	8	1,70	0,10	5,68
EXP 23	10	1,70	0,09	5,54
EXP 23	10	1,70	0,07	4,20
EXP 23	10	1,80	0,05	2,85
EXP 24	14	1,60	0,05	3,36
EXP 24	14	1,50	0,03	1,91
EXP 24	14	1,50	0,06	4,04
EXP 41	14	1,60	0,05	3,12
EXP 41	14	1,50	0,01	0,54
EXP 41	14	1,60	0,09	5,65
EXP 75	8	1,70	0,07	3,87
EXP 75	8	1,80	0,03	1,40
EXP 75	8	1,80	0,05	2,95
EXP 76	8	1,70	0,10	5,73
EXP 76	8	1,80	0,12	6,93
EXP 76	8	1,80	0,05	2,89
EXP 72	10	1,80	0,01	0,28
EXP 72	10	1,60	0,05	2,84
EXP 73	14	1,60	0,03	1,80
EXP 73	14	1,60	0,04	2,52
EXP 73	14	1,60	0,09	5,74
EXP 74	14	1,50	0,07	4,53
EXP 74	14	1,60	0,11	7,01
EXP 74	14	1,60	0,07	4,10



Kuva 23. Hb A ja Hb Fac vyöhykkeiden välinen ero FAS-kontrollissa (hyväksymisraja ≥ 0.75 mm).

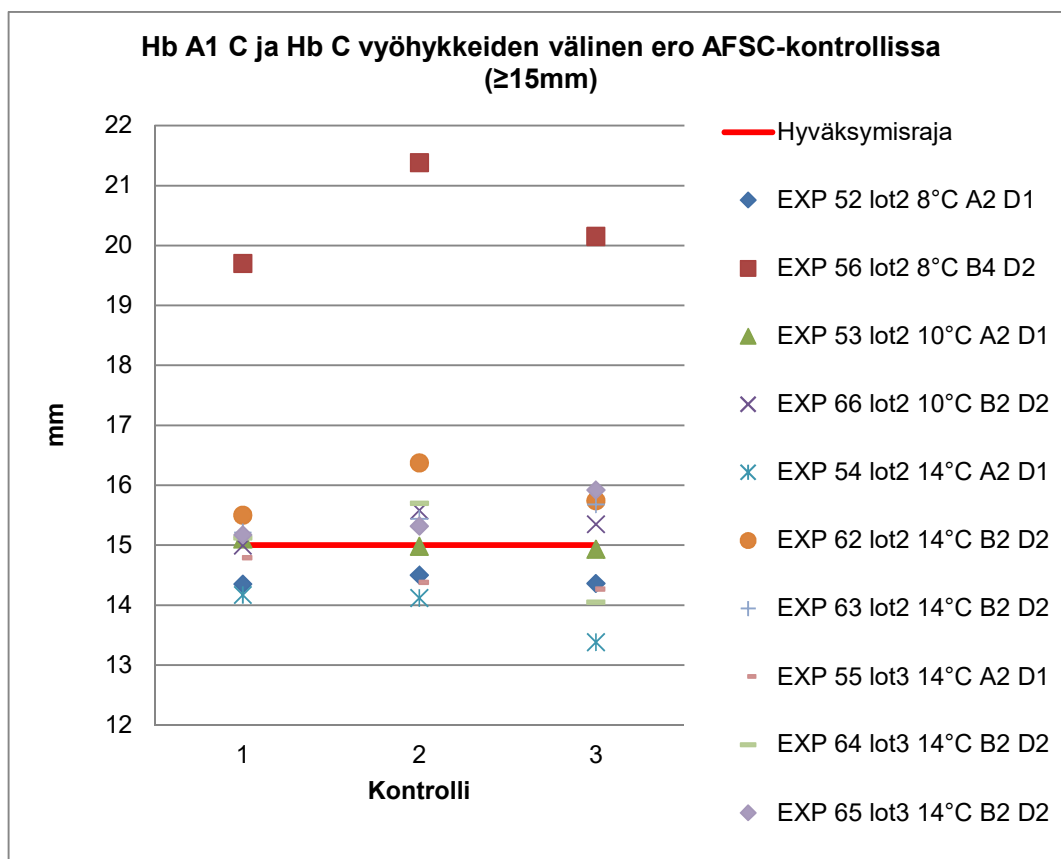


Kuva 24. Hb A ja Hb Fac vyöhykkeiden välinen ero FAS-kontrollissa (hyväksymisraja $\geq 0.75\text{ mm}$).

Taulukko 13. Tulokset Hb A ja Hb Fac välisistä eroista FAS-kontrollissa kolmen yksikön sarjassa.

EXP	Lämpötila (°C)	Keskiarvo (mm)	Keskihajonta (mm)	RSD (%)
EXP 22	8	0,88	0,12	14,15
EXP 40	8	1,06	0,05	4,96
EXP 40	8	0,88	0,11	12,60
EXP 40	8	0,92	0,13	13,83
EXP 23	10	0,83	0,09	11,43
EXP 23	10	0,97	0,10	9,83
EXP 23	10	0,91	0,10	11,13
EXP 24	14	0,86	0,09	10,55
EXP 24	14	0,84	0,05	5,46
EXP 24	14	0,85	0,10	11,86
EXP 41	14	0,99	0,12	11,74
EXP 41	14	0,91	0,12	13,23
EXP 41	14	0,98	0,13	13,47
EXP 75	8	0,84	0,08	9,69
EXP 75	8	0,89	0,10	11,22
EXP 75	8	0,92	0,06	6,36
EXP 76	8	0,88	0,11	12,13
EXP 76	8	0,86	0,03	3,20
EXP 76	8	0,89	0,02	2,43
EXP 72	10	0,88	0,03	3,41
EXP 72	10	0,90	0,05	5,91
EXP 73	14	0,97	0,05	5,08
EXP 73	14	0,99	0,10	9,67
EXP 73	14	0,94	0,08	8,79
EXP 74	14	0,89	0,10	11,17
EXP 74	14	0,89	0,04	4,80
EXP 74	14	0,91	0,08	9,21

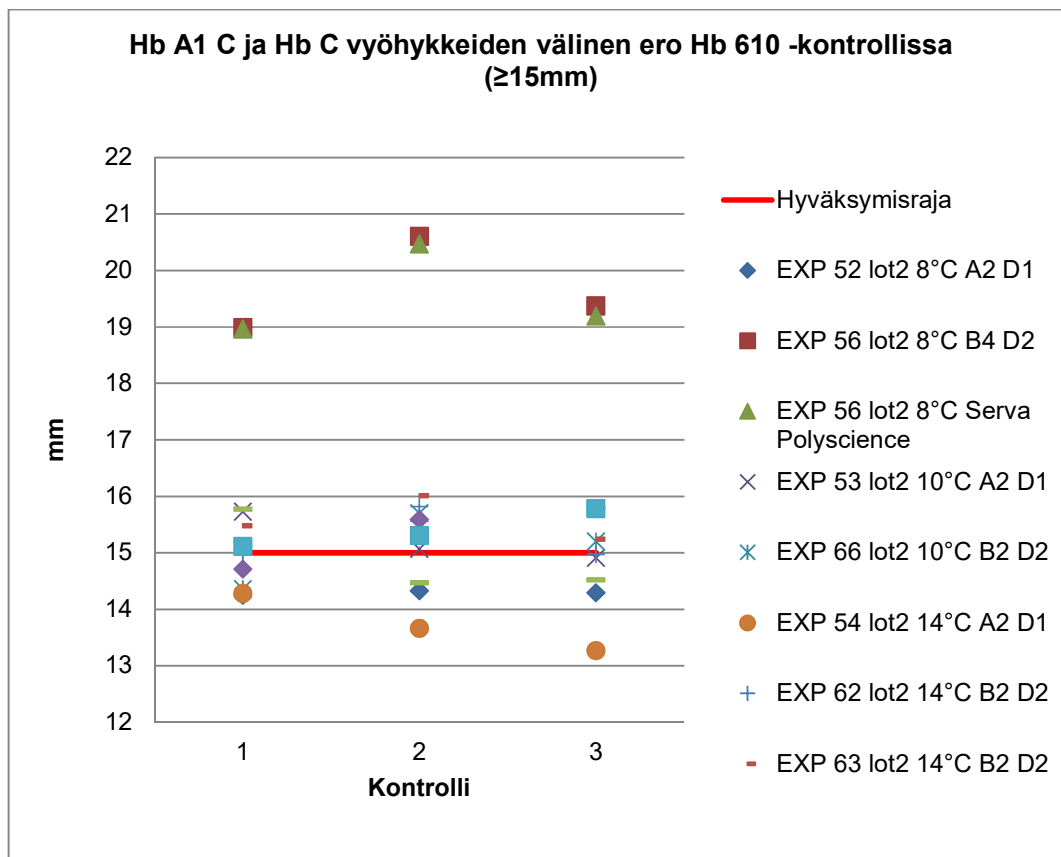
6.3 Pienet geelit



Kuva 25. Hb A1 C ja Hb C vyöhykkeiden välinen ero AFSC-kontrollissa (hyväksymisraja ≥ 15.0 mm).

Taulukko 14. Tulokset Hb A1 C ja Hb C välisistä eroista AFSC-kontrollissa pienillä geeleillä.

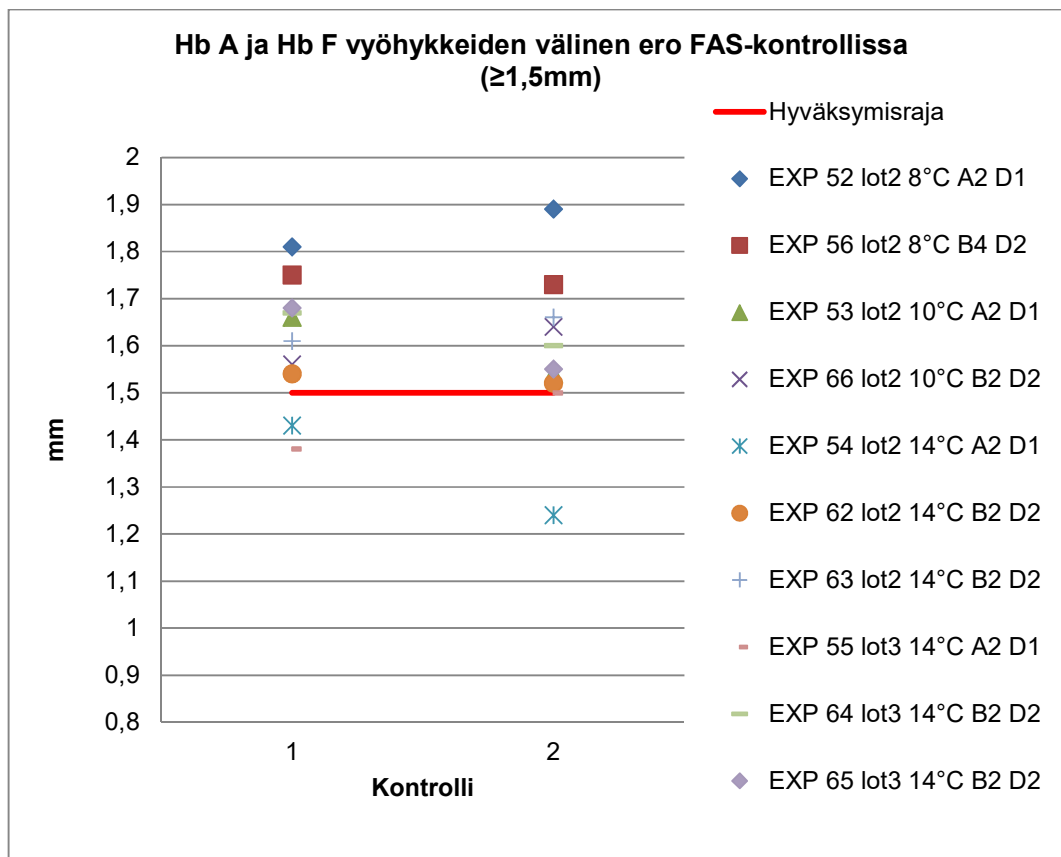
EXP	Lämpötila (°C)	Keskiarvo (mm)	Keskihajonta (mm)	RSD (%)
EXP 52	8	14,40	0,08	0,58
EXP 56	8	20,40	0,87	4,26
EXP 53	10	15,00	0,09	0,58
EXP 66	10	15,30	0,30	1,94
EXP 54	14	13,90	0,44	3,18
EXP 62	14	15,90	0,45	2,83
EXP 63	14	15,40	0,24	1,53
EXP 55	14	14,50	0,27	1,89
EXP 64	14	15,00	0,84	5,58
EXP 65	14	15,50	0,40	2,56



Kuva 26. Hb A1 C ja Hb C vyöhykkeiden välinen ero Hb 610 -kontrollissa (hyväksymisraja ≥ 15.0 mm).

Taulukko 15. Tulokset Hb A1 C ja Hb C välisistä eroista Hb610-kontrollissa pienillä geeleillä.

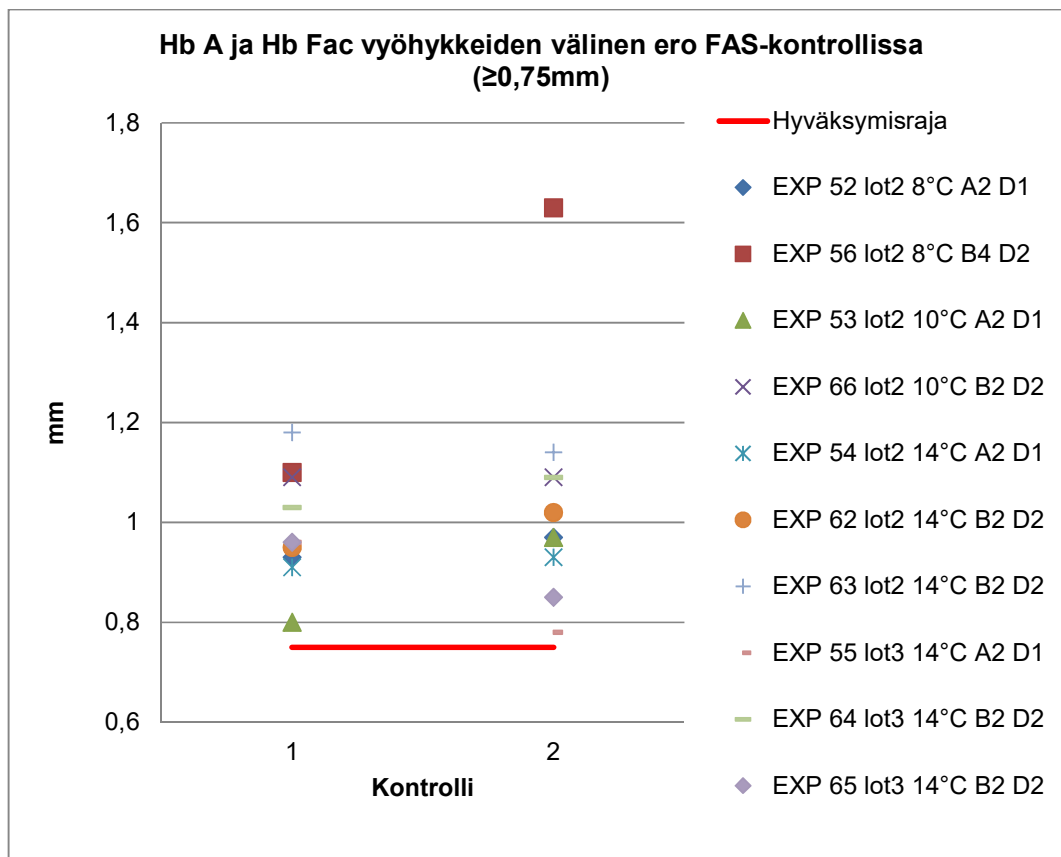
EXP	Lämpötila (°C)	Keskiarvo (mm)	Keskihajonta (mm)	RSD (%)
EXP 52	8	14,30	0,04	0,28
EXP 56	8	19,70	0,84	4,27
EXP 53	10	15,20	0,43	2,86
EXP 66	10	15,10	0,68	4,48
EXP 54	14	13,70	0,51	3,72
EXP 62	14	15,30	0,49	3,17
EXP 63	14	15,60	0,39	2,53
EXP 55	14	14,90	0,74	4,94
EXP 64	14	15,40	0,57	3,71
EXP 65	14	15,40	0,34	2,23



Kuva 27. Hb A ja Hb F vyöhykkeiden välinen ero FAS-kontrollissa (hyväksymisraja ≥ 1.5 mm).

Taulukko 16. Tulokset Hb A ja Hb F välisistä eroista FAS-kontrollissa pienillä geeleillä.

EXP	Lämpötila (°C)	Keskiarvo (mm)	Keskihajonta (mm)	RSD (%)
EXP 52	8	1,90	0,06	2,98
EXP 56	8	1,70	0,01	0,83
EXP 53	10	1,60	0,08	5,30
EXP 66	10	1,60	0,06	3,54
EXP 54	14	1,30	0,13	10,33
EXP 62	14	1,50	0,01	0,94
EXP 63	14	1,60	0,04	2,21
EXP 55	14	1,40	0,08	6,06
EXP 64	14	1,60	0,05	3,09
EXP 65	14	1,60	0,09	5,75

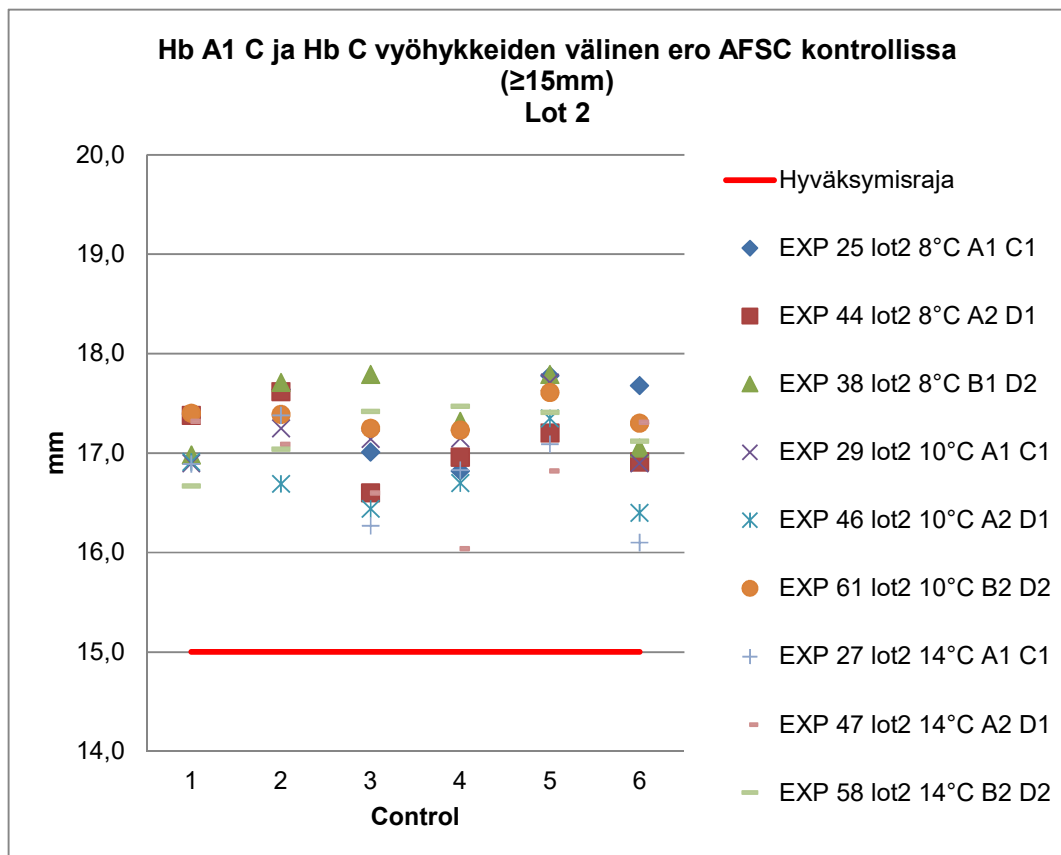


Kuva 28. Hb A ja Hb Fac vyöhykkeiden välinen ero FAS-kontrollissa (hyväksymisraja ≥ 0.75 mm).

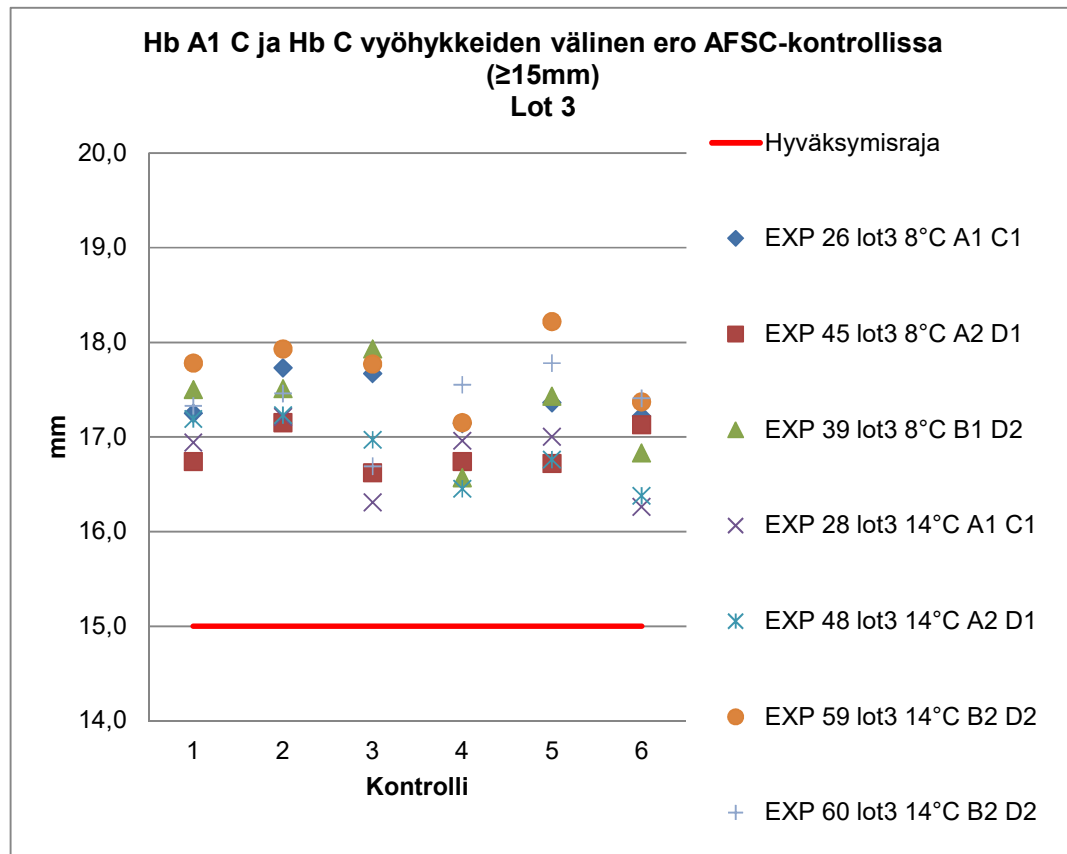
Taulukko 17. Tulokset Hb A ja Hb Fac välisistä eroista FAS-kontrollissa pienillä geeleillä.

EXP	Lämpötila (°C)	Keskiarvo (mm)	Keskihajonta (mm)	RSD (%)
EXP 52	8	0,95	0,03	2,98
EXP 56	8	1,37	0,37	27,36
EXP 53	10	0,89	0,12	13,51
EXP 66	10	1,09	0,00	0,00
EXP 54	14	0,92	0,01	1,54
EXP 62	14	0,99	0,05	5,00
EXP 63	14	1,16	0,03	2,44
EXP 55	14	0,87	0,13	14,63
EXP 64	14	1,06	0,04	4,00
EXP 65	14	0,91	0,08	8,55

6.4 Tehon lisäys 40 Wattiin



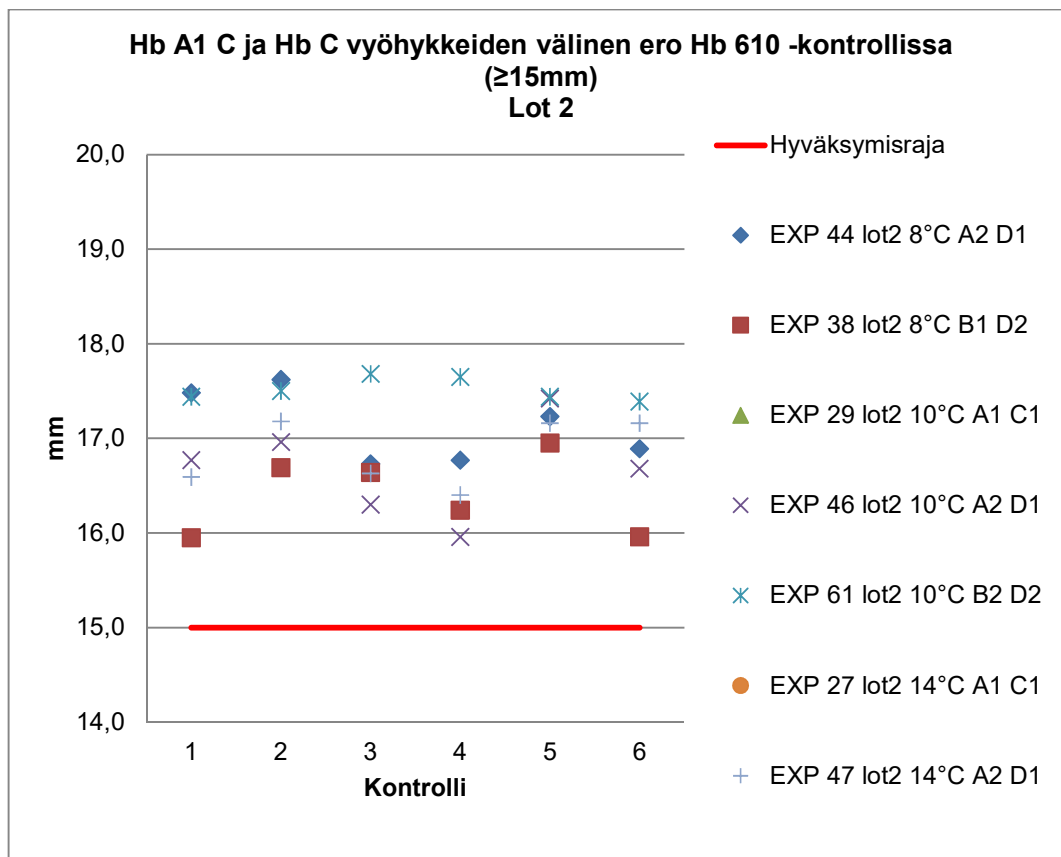
Kuva 29. Hb A1 C ja Hb C vyöhykkeiden välinen ero AFSC-kontrollissa (hyväksymisraja ≥ 15.0 mm).



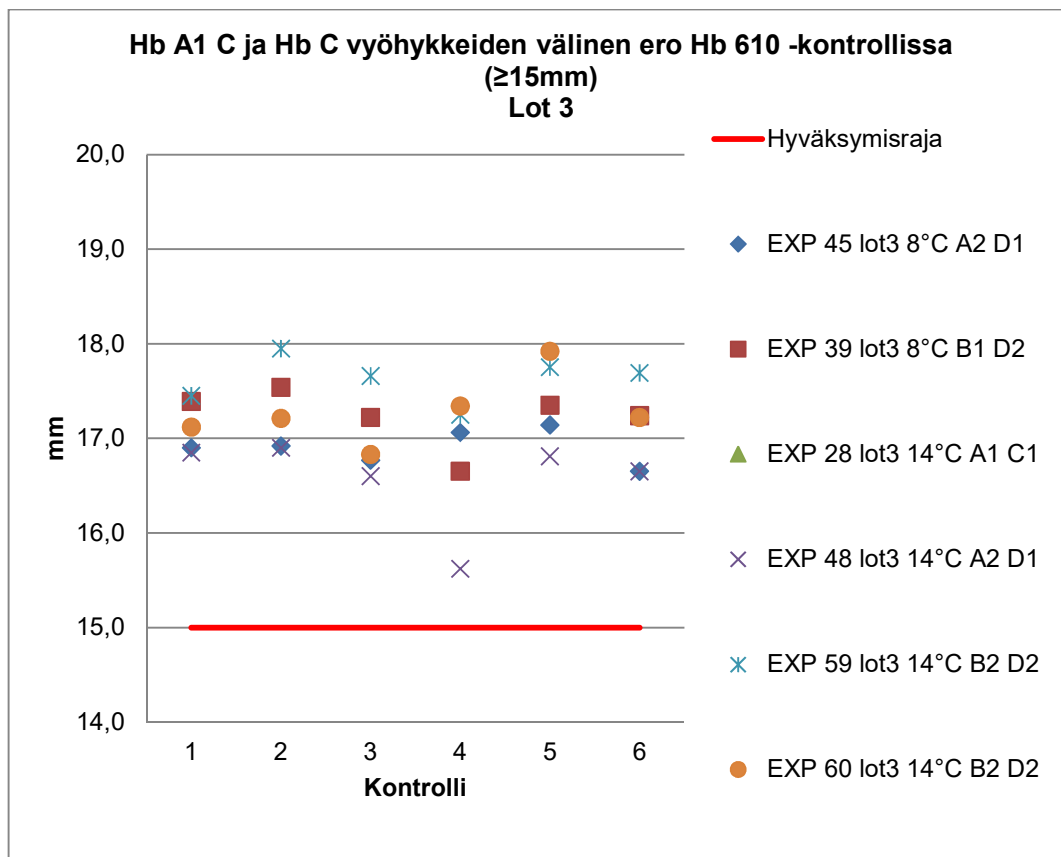
Kuva 30. Hb A1 C ja Hb C vyöhykkeiden välinen ero AFSC-kontrollissa (hyväksymisraja ≥ 15.0 mm).

Taulukko 18. Tulokset Hb A1 C ja Hb C välisistä eroista AFSC-kontrollissa tehon lisäyksessä 40 Wattiin.

EXP	Lämpötila (°C)	Keskiarvo (mm)	Keskihajonta (mm)	RSD (%)
EXP 25	8	17,40	0,39	2,25
EXP 44	8	17,10	0,36	2,13
EXP 38	8	17,40	0,37	2,14
EXP 26	8	17,40	0,25	1,42
EXP 45	8	16,90	0,23	1,36
EXP 39	8	17,30	0,50	2,89
EXP 29	10	17,20	0,30	1,73
EXP 46	10	16,70	0,35	2,09
EXP 61	10	17,40	0,14	0,80
EXP 27	14	16,80	0,49	2,90
EXP 47	14	16,90	0,49	2,91
EXP 58	14	17,20	0,31	1,80
EXP 28	14	16,80	0,40	2,35
EXP 48	14	16,80	0,36	2,16
EXP 59	14	17,70	0,39	2,18
EXP 60	14	17,40	0,37	2,11



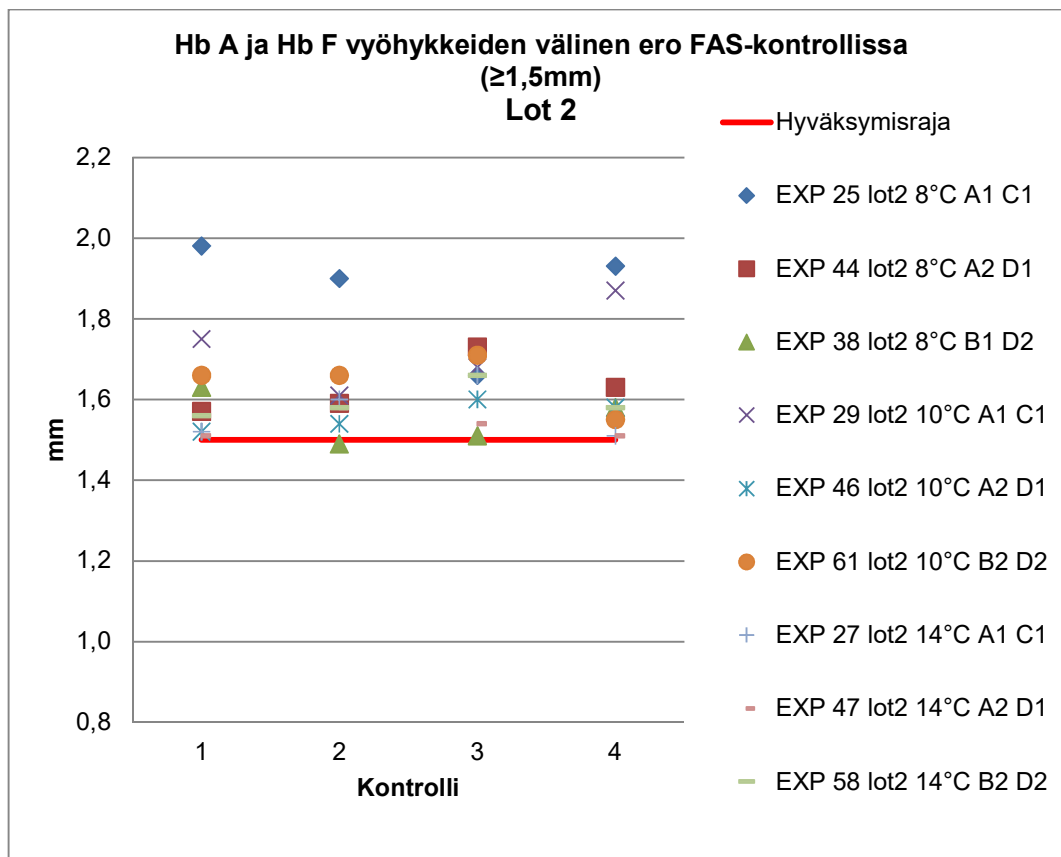
Kuva 31. Hb A1 C ja Hb C vyöhykkeiden välinen ero Hb 610 -kontrollissa (hyväksymisraja ≥ 15.0 mm).



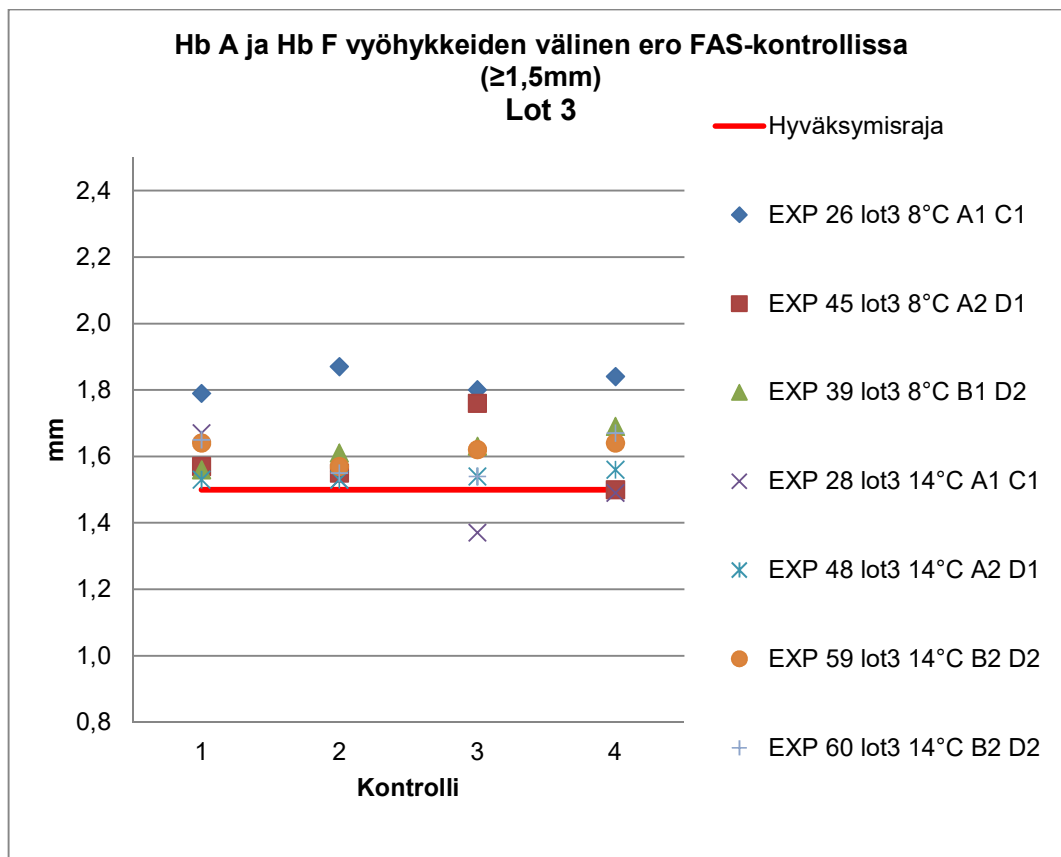
Kuva 32. Hb A1 C ja Hb C vyöhykkeiden välinen ero Hb 610 -kontrollissa (hyväksymisraja ≥ 15.0 mm).

Taulukko 19. Tulokset Hb A1 C ja Hb C välisistä eroista Hb610-kontrollissa tehon lisäyksessä 40 Wattiin.

EXP	Lämpötila (°C)	Keskiarvo (mm)	Keskihajonta (mm)	RSD (%)
EXP 44	8	17,10	0,38	2,22
EXP 38	8	16,40	0,42	2,54
EXP 26	8	16,90	0,18	1,07
EXP 45	8	17,20	0,31	1,79
EXP 29	10	16,70	0,51	3,05
EXP 46	10	17,50	0,12	0,69
EXP 47	14	16,90	0,35	2,08
EXP 48	14	16,60	0,48	2,89
EXP 59	14	17,60	0,24	1,39
EXP 60	14	17,30	0,36	2,08



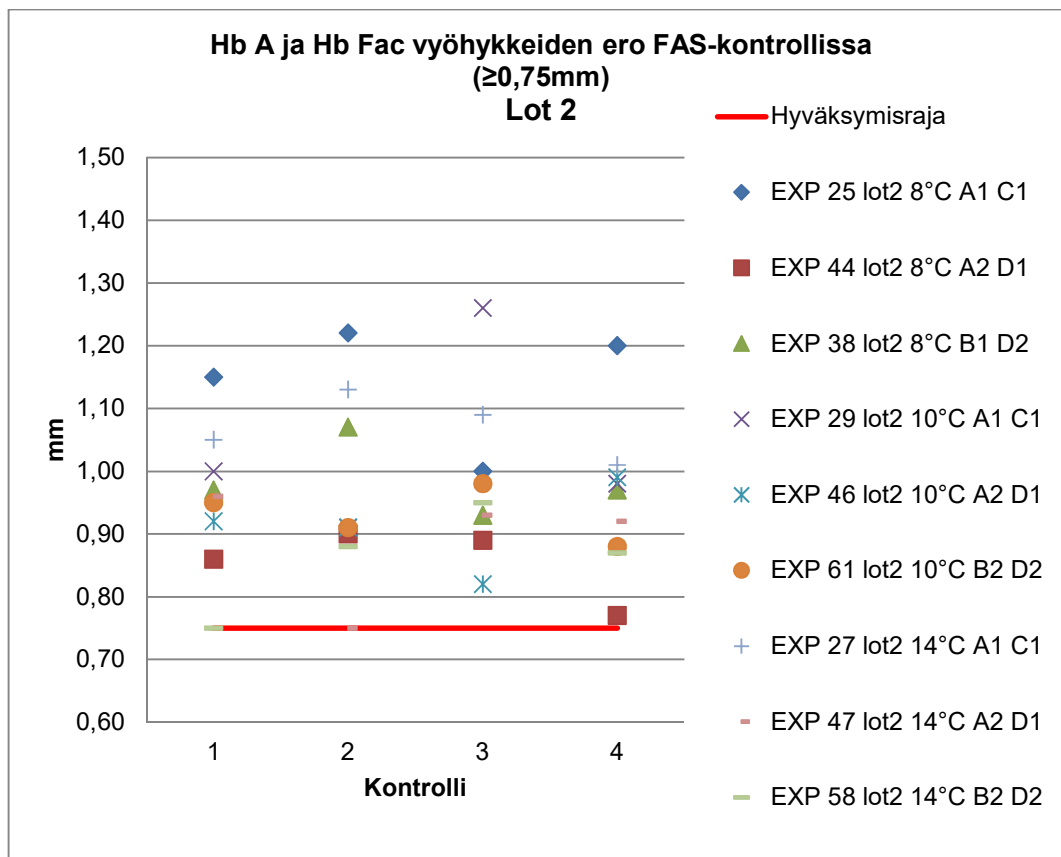
Kuva 33. Hb A ja Hb F vyöhykkeiden välinen ero FAS-kontrollissa (hyväksymisraja ≥ 1.5 mm).



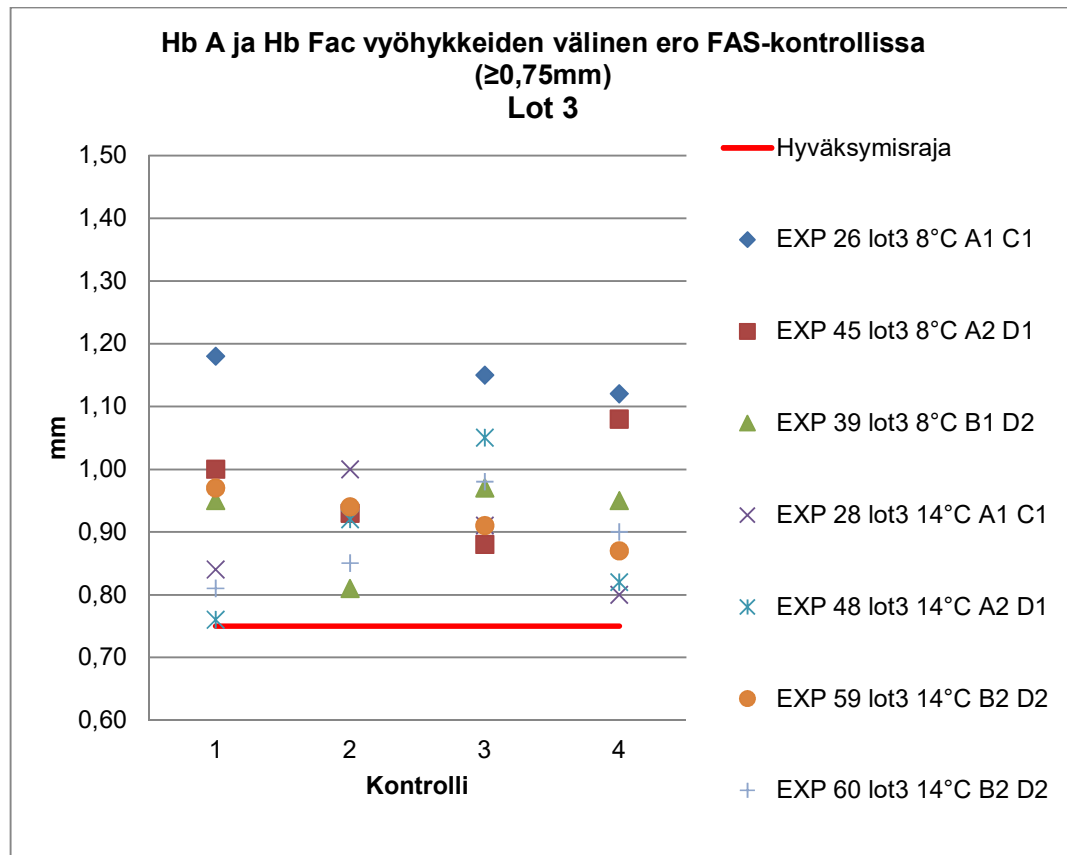
Kuva 34. Hb A ja Hb F vyöhykkeiden välinen ero FAS-kontrollissa (hyväksymisraja ≥ 1.5 mm).

Taulukko 20. Tulokset Hb A ja Hb F välisistä eroista FAS-kontrollissa tehon lisäyksessä 40 Wattiin.

EXP	Lämpötila (°C)	Keskiarvo (mm)	Keskihajonta (mm)	RSD (%)
EXP 25	8	1,90	0,14	7,48
EXP 44	8	1,60	0,07	4,45
EXP 38	8	1,60	0,06	4,03
EXP 26	8	1,80	0,04	2,05
EXP 45	8	1,60	0,11	7,12
EXP 39	8	1,60	0,05	3,36
EXP 29	10	1,70	0,11	6,52
EXP 46	10	1,60	0,04	2,28
EXP 61	10	1,60	0,07	4,22
EXP 27	14	1,60	0,07	4,43
EXP 47	14	1,50	0,03	2,21
EXP 58	14	1,60	0,04	2,77
EXP 28	14	1,50	0,12	8,25
EXP 48	14	1,50	0,01	0,94
EXP 59	14	1,60	0,03	2,07
EXP 60	14	1,60	0,07	4,19



Kuva 35. Hb A ja Hb Fac vyöhykkeiden välinen ero FAS-kontrollissa (hyväksymisraja $\geq 0,75\text{ mm}$).

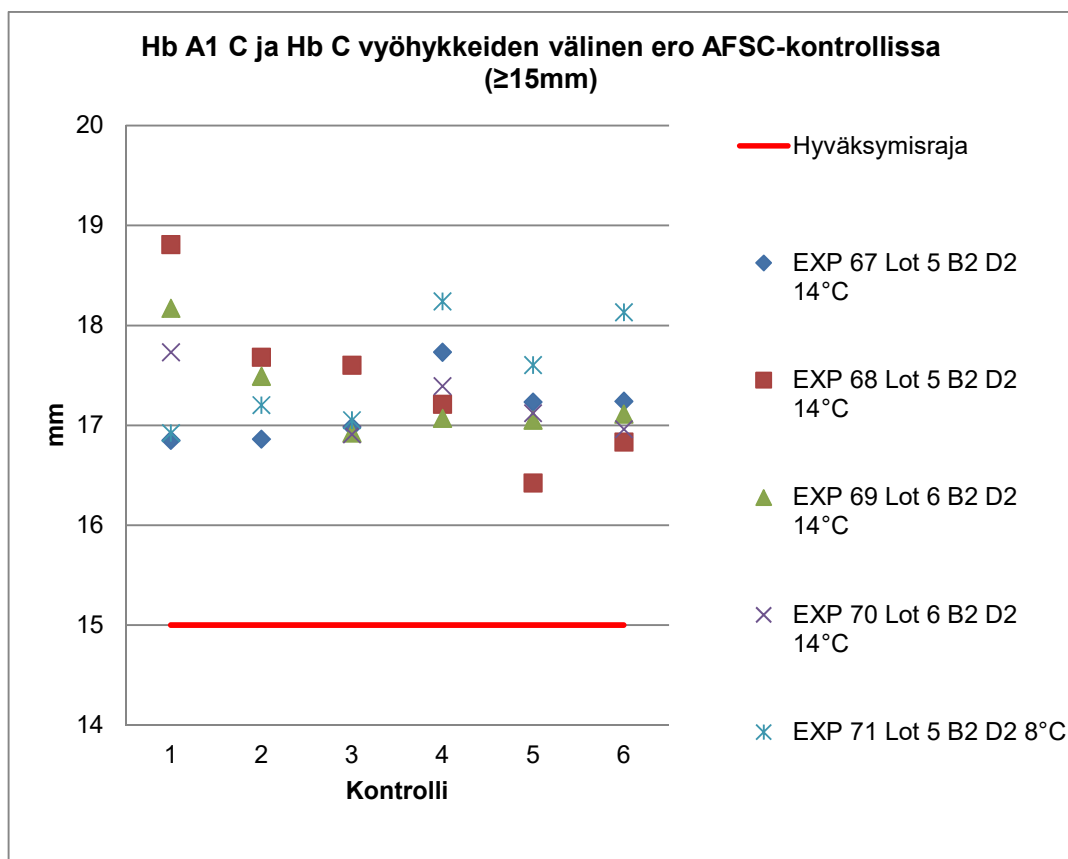


Kuva 36. Hb A ja Hb Fac vyöhykkeiden välinen ero FAS-kontrollissa (hyväksymisraja $\geq 0,75\text{ mm}$).

Taulukko 21. Tulokset Hb A ja Hb Fac välisistä eroista Fac-kontrollissa tehon lisäyksessä 40 Wattiin.

EXP	Lämpötila (°C)	Keskiarvo (mm)	Keskihajonta (mm)	RSD (%)
EXP 25	8	1,14	0,10	8,72
EXP 44	8	0,86	0,06	6,88
EXP 38	8	0,99	0,06	6,03
EXP 26	8	1,10	0,11	9,80
EXP 45	8	0,97	0,09	8,96
EXP 39	8	0,92	0,07	8,04
EXP 29	10	1,04	0,15	14,74
EXP 46	10	0,91	0,07	7,67
EXP 61	10	0,93	0,04	4,73
EXP 27	14	1,07	0,05	4,83
EXP 47	14	0,89	0,09	10,66
EXP 58	14	0,86	0,08	9,65
EXP 28	14	0,89	0,09	9,85
EXP 48	14	0,89	0,13	14,25
EXP 59	14	0,92	0,04	4,64
EXP 60	14	0,89	0,07	8,23

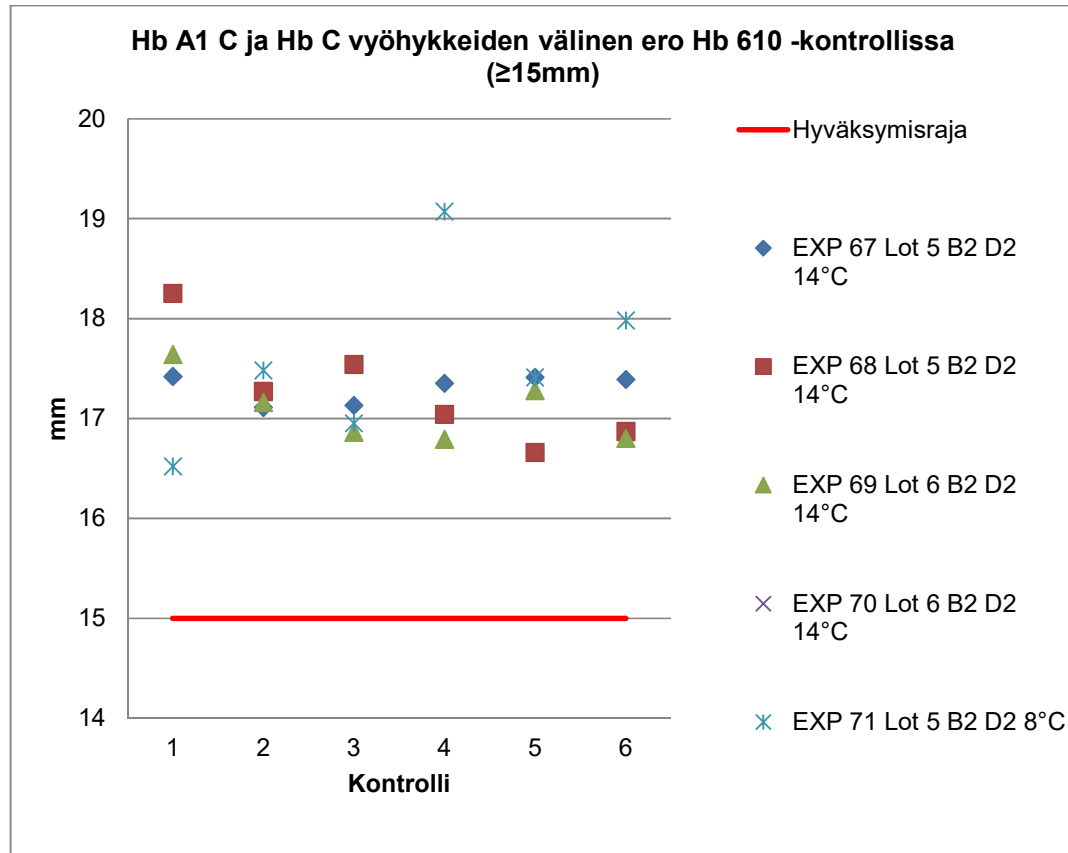
6.5 Olosuhdehuone



Kuva 37. Hb A1 C ja Hb C vyöhykkeiden välinen ero AFSC-kontrollissa (hyväksymisraja ≥ 15.0 mm).

Taulukko 22. Tulokset Hb A1 C ja Hb C välisistä eroista AFSC-kontrollissa olosuhdehuoneessa.

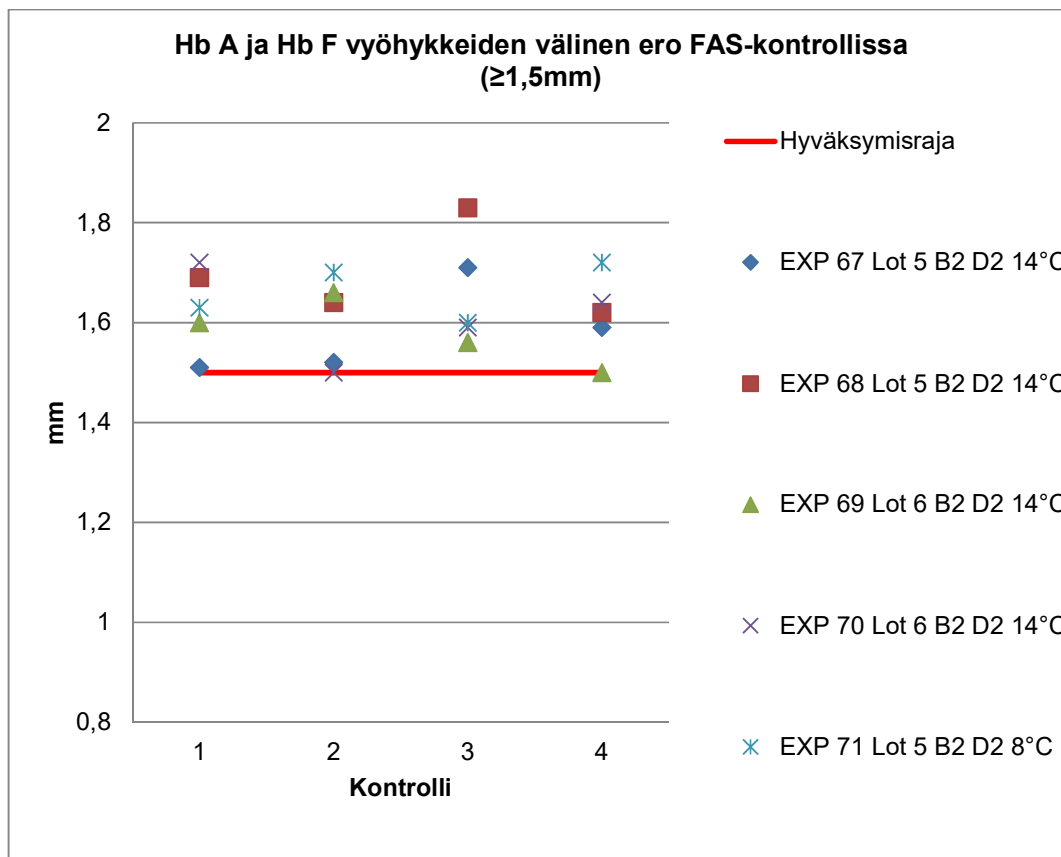
EXP	Lämpötila (°C)	Keskiarvo (mm)	Keskihajonta (mm)	RSD (%)
EXP 67	14	17,10	0,33	1,95
EXP 68	14	17,40	0,83	4,76
EXP 69	14	17,30	0,47	2,70
EXP 70	14	17,22	0,34	1,97
EXP 71	8	17,50	0,56	3,21



Kuva 38. Hb A1 C ja Hb C vyöhykkeiden välinen ero Hb 610 -kontrollissa (hyväksymisraja ≥ 15.0 mm).

Taulukko 23. Tulokset Hb A1 C ja Hb C välisistä eroista Hb610-kontrollissa olosuhdehuoneessa.

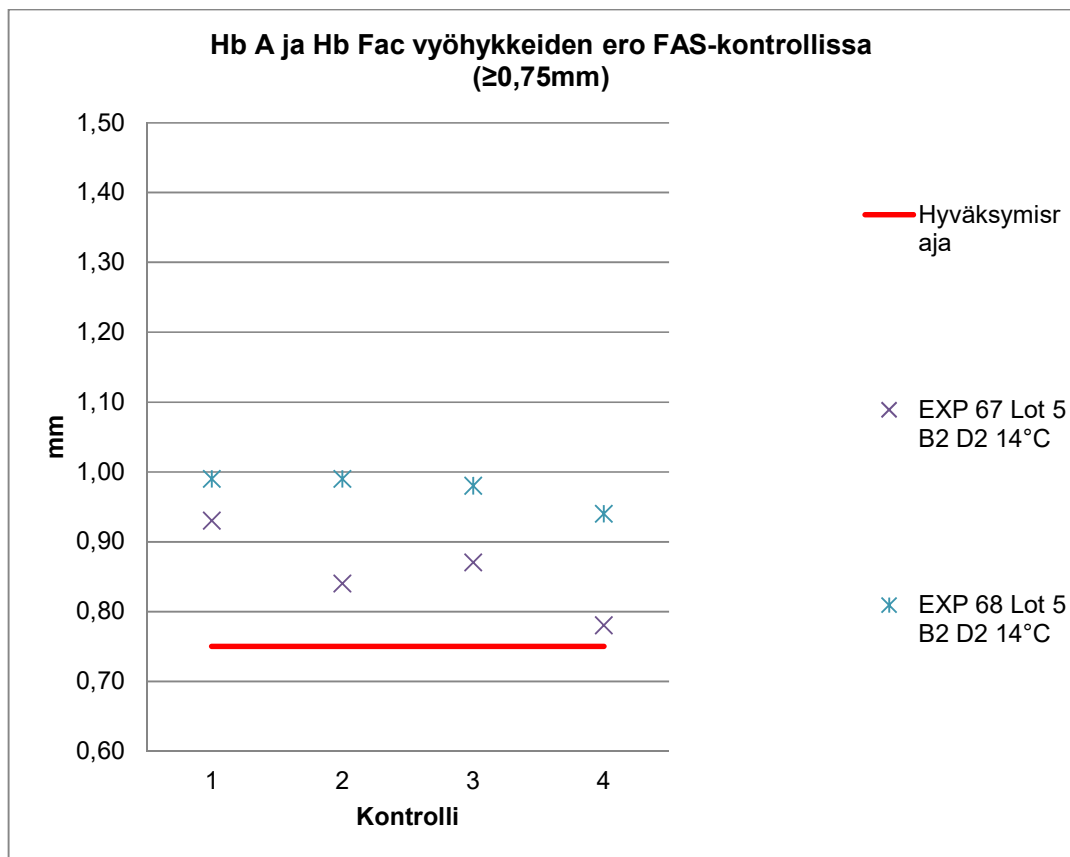
EXP	Lämpötila (°C)	Keskiarvo (mm)	Keskihajonta (mm)	RSD (%)
EXP 67	14	17,30	0,14	0,83
EXP 68	14	17,30	0,57	3,29
EXP 69	14	17,10	0,34	1,98
EXP 71	8	17,60	0,89	5,04



Kuva 39. Hb A ja Hb F vyöhykkeiden välinen ero FAS-kontrollissa (hyväksymisraja ≥ 1.5 mm).

Taulukko 24. Tulokset Hb A ja Hb F välisistä eroista FAS-kontrollissa olosuhdehuoneessa.

EXP	Lämpötila (°C)	Keskiarvo (mm)	Keskihajonta (mm)	RSD (%)
EXP 67	14	1,60	0,09	5,76
EXP 68	14	1,70	0,09	5,57
EXP 69	14	1,60	0,07	4,21
EXP 70	14	1,60	0,09	5,76
EXP 71	8	1,70	0,06	3,34



Kuva 40. Hb A ja Hb Fac vyöhykkeiden välinen ero FAS-kontrollissa (hyväksymisraja $\geq 0,75\text{ mm}$).

Taulukko 25. Tulokset Hb A ja Hb Fac välisistä eroista Fac-kontrollissa olosuhdehuoneessa.

EXP	Lämpötila (°C)	Keskiarvo (mm)	Keskihajonta (mm)	RSD (%)
EXP 67	14	0,86	0,06	7,26
EXP 68	14	0,98	0,02	2,43

7 PÄÄTELMÄT

Karakterisoinnin perusteella lämpötilan vaikutukset laitteiston erottelukykyyyn ovat pieniä. Vanha laite ja uusi laite toimivat yhtäläisesti 8 - 14 °C välillä. Korkeissa lämpötiloissa on kuitenkin havaittavissa, että lot 1:lla kontrollien vyöhykkeiden välinen ero kaventuu, mutta on silti rajoissa. Lot 2:lla erot lämpötilojen ja laitteiden välillä ovat erottamattomia. Kolmella laitteellakin ajettaessa lämpötilan vaikutukset erottumiseen oli pieni. Kolmen yksikön sarjassa sekä vanhan laitteen että uuden laitteen tulokset olivat hyväksymisrajojen sisällä. Jotkin yksittäiset kontrollit eivät olleet rajoissa, mutta kaikkien kontrollien keskiarvot tuloksista olivat rajoissa. Laitteiden kuvat ovat liitteessä 5 (luottamuksellinen).

Myös tehon muutoksen vaikutus tuloksiin oli hyvin pientä. Vyöhykkeiden matkat elektrodeilta olivat samalla tasolla ja kontrollit olivat hyväksyttäviä käytettäessä sekä 40 W että 30 W. Ympäröivän lämpötilan ja kosteuden nostamisella ei myöskään ollut kriittistä vaikutusta tuloksiin. Olosuhdekaapissa 8 °C ajetuissa geeleissä vyöhykkeillä on aavistuksen tasaisempi ajautuvuus geelin sisällä, joten lämpötila ja kosteus lisäävät hajontaa.

Pienillä geeleillä elektrodien väli on 80 mm eli 10 mm lyhyempi kuin isoilla geeleillä. Sen vuoksi vyöhykkeetkin ovat kulkeutuneet lyhyemmän matkan. Tulokset eri laitteistojen välillä ovat saman suuntaisia, vain yksi ajo poikkeaa tuloksista parempana erottumisena. 15 mm hyväksymisraja Hb A1 C:n ja Hb C:n välillä AFSC ja Hb 610 kontrolleissa on asetettu isomman geelin mukaan, eikä sen vuoksi sovellu suoraan pienelle geelille. Myös FAS-kontrollissa Hb A:n ja HB Fac:n välinen ero on asetettu isomman geelin mukaan. Juuri nämä tulokset eivät ylittäneet hyväksymisrajaa, mikä on haasteena myös tuotannon laadunvalvonnassa. Tuloksista huomattiin myös, että 10 °C pienten geelien vyöhykkeiden ajautuminen oli rajoissa, mutta 14 °C ja 8 °C tulokset eivät enää olleet hyväksyntärajojen mukaisia. Uudella laitteella tehty testi 8 °C ja elektrodien välin ollessa 90 mm vyöhykkeet ajautuivat pidemmälle kuin samassa lämpötilassa vanha laitteella elektrodien välin ollessa 80 mm.

Kaikissa testeissä huomattiin FAS-kontrollin vyöhykkeiden ajautumisen suhteellisen keskihajonnan olevan suurempi kuin AFCS ja Hb 610 -kontrolleissa. FAS kontrollissa mitattavat vyöhykkeet ovat lähempänä toisiaan kuin kahdessa muussa kontrollissa.

Karakterisoinnin loppupäätelmänä vanha laite ja uusi laite toimivat samalla tavalla ja molempia voidaan käyttää geelياجossa vesijäähdyttimen lämpötilan ollessa 8 °C - 14 °C.

Laitteen myynti on kasvanut lämpimiin maihin, mm. Nigeriaan ja Intiaan, joten karakterisoinnin perusteella osoitettiin myös, että geeliajo toimii kosteassa ja kuumassa ilmassa. Karakterisoinnin loputtua uutta laitetta siirryttiin verifioimaan myös Wallac Oy:n asiakaslaboratorioihin niiden oikeassa käyttöympäristössä.

LÄHTEET

1. Hocking, D.R. 1997. The Separation and identification of Hemoglobin Variants by Isoelectric Focusing Electrophoresis: An Interpretive Guide. S. 10, 14-19. PerkinElmer Life Sciences Inc. Akron OH, USA.
2. <http://www.differencebetween.com/difference-between-iron-and-vs-hemoglobin/>. Viitattu 10.11.2017.
3. Westmeier, R., Gronau, S., Beckett, P., Berkelman, T., Büllles, J., Schickle, H. and Theßeling, G. 2001. Electrophoresis in Practise. s. 2, 45-46, 48-50. Saksa: WILEY-VCH Verlag GmbH, D-69469 Weinheim (Federal Republic of Germany)
4. https://www.uvm.edu/~vgn/outreach/documents/Garfin_IEF_WebArticle9-07.pdf. Viitattu 2.6.2017.
5. <https://senthilarivan.wordpress.com/2015/12/06/isoelectric-focusing/>. Viitattu 07.06.2017.
6. Pagliaro, M, Clark, J.H., Rossi, M. & Kraus, G.A. 2010. The Future of Glycerol. Royal Society of Chemistry. Englanti. Viitattu 9.12.2017. Saatavilla Internetissä <https://ebookcentral.proquest.com/lib/turkuamk-ebooks/reader.action?docID=1185558&ppg=18>.
7. McHugh, D. J.; Armisen, R. & Galatas, F. 1987. Production and Utilisation of Products from Commercial Seaweeds. Rooma. Viitattu 9.12.2017. Saatavilla Internetissä <http://www.fao.org/docrep/X5822E/x5822e00.htm#Contents>. Food and Agriculture Organization of the United Nations.
8. <http://tpe-cuisine-moleculaire-montaigne.e-monsite.com/pages/la-gelification-a-l-agar-agar.html>. Viitattu 10.12.2017
9. Lichstein, H.C. and Soule, M.H., 1944. Studies of the effect of sodium azide on microbic growth and respiration. I The Action of Sodium Azide On Microbic Growth. s. 222-225. USA. Viitattu: 15.5.2018. Saatavilla Internetissä <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC373901/>.
10. Wallac Oy. 2017. New Product Development NPD13903590_ENG
11. Wallac Oy. 2017. PowerPoint-esitys. 2017-05-05 pres 1 to Wallac_ process validation.
12. Anita Kuvaja, Quality Director / Wallac Oy. Haastattelu 14.12.2017.
13. Hovinen, T., Vihanto, J. 2016. Validointi_laitteet_prosessit, luentomateriaali, Turun AMK.
14. Wallac Oy. 2017. FR-9120, kitti-inserttiohje.
15. Wallac Oy. 2017. 13905417 Hb-geelien ajo-ohje.
16. Canterbury Scientific Ltd. 2017. Haemoglobin FASC Variant Control. Näytteen rekonstituutio-ohje.
17. Harris, D.C., 2013. Exploring Chemical Analysis. Fifth Edition. s. 78-79. USA.

Karakterisointisuunnitelma

Tiedot luottamuksellisia.

Soveltuvuustutkimuksen suunnitelma

Tiedot luottamuksellisia.

Testien numerointi

Tiedot luottamuksellisia.

Laitteet selkokielellä

Tiedot luottamuksellisia.

Kuvat laitteista

Tiedot luottamuksellisia.

